



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Direttore Prof. Mario Petrinì

Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area
Critica
Direttore Prof. Paolo Miccoli

Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in
Medicina e Chirurgia
Direttore Prof. Giulio Guido

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA E CHIRURGIA

“L’eziologia dell’epatopatia di base condiziona
la presentazione clinica e il decorso
dell’epatocarcinoma: studio di coorte in
singolo centro con osservazione di 10 anni”

RELATORI

Dr. Maurizia Rossana Brunetto

Dr. Filippo Oliveri

CANDIDATO

Ilaria Maria Di Somma

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

INDICE

INTRODUZIONE	2
1. Epidemiologia.....	2
2. Epatocarcinogenesi	5
3. Eziologia	7
4. Prevenzione.....	13
5. Diagnosi	20
6. Terapia del carcinoma epatocellulare	40
 OBIETTIVO DELLO STUDIO	 62
 PAZIENTI E METODI	 63
1. Pazienti.....	63
2. Metodi.....	63
3. Analisi statistica.....	65
 RISULTATI	 66
1. Caratteristiche al basale della coorte	66
2. Influenza dell’eziologia sulle caratteristiche basali e sugli esiti clinici.....	70
3. Analisi dei fattori che influenzano la sopravvivenza.....	74
4. Nuovo score prognostico	76
 DISCUSSIONE	 80
 CONCLUSIONI	 84
 BIBLIOGRAFIA	 86

INTRODUZIONE

1. Epidemiologia

Il carcinoma epatocellulare (Hepatocellular Carcinoma, HCC) è la neoplasia epatica più comune (85% dei tumori primitivi del fegato) e costituisce la sesta neoplasia solida a livello mondiale per incidenza¹, la quinta nell'uomo e la settima nella donna, rappresentando il 5% di tutti i tumori. Nella maggior parte dei casi, l'epatocarcinoma si sviluppa in pazienti con malattia epatica cronica evoluta in cirrosi, di cui costituisce una delle complicanze principali. L'associazione patogenetica fra epatopatia cronica e HCC spiega la stretta dipendenza dell'epidemiologia dell'HCC da quella della sottostante malattia di fegato. Ciò appare particolarmente evidente per quanto riguarda la correlazione fra endemia dell'infezione/malattia da HBV e HCC, le aree a maggior incidenza di HCC nel mondo coincidendo con le aree a più elevata endemia dell'infezione da virus dell'epatite B, (Hepatitis B Virus, HBV), per il quale è nota anche una azione oncogenetica diretta (Fig.1).

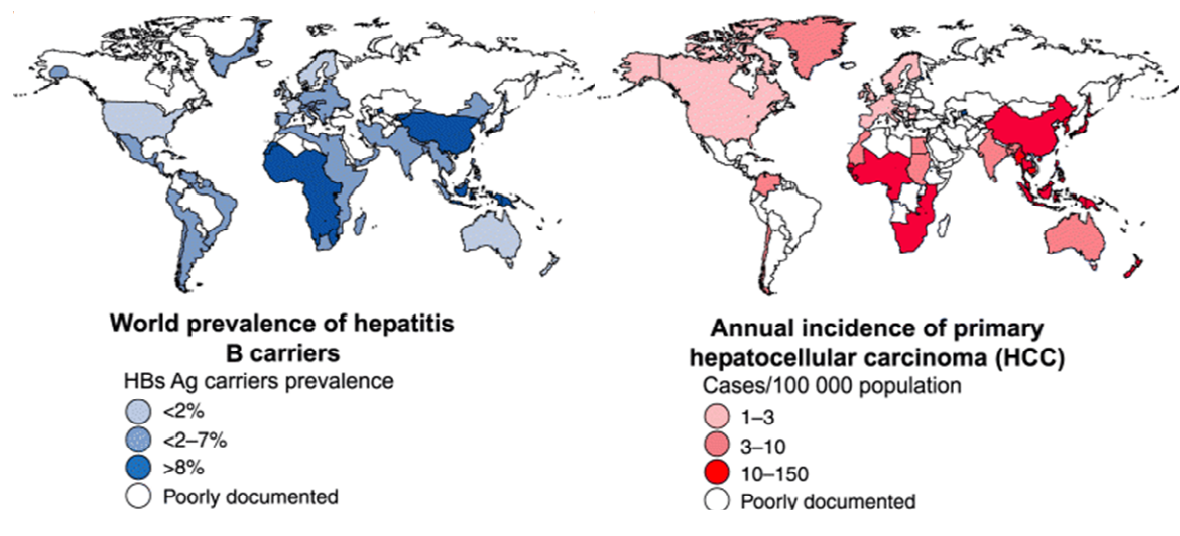


Figura 1. Prevalenza di infezione da HBV e incidenza annuale di HCC nel mondo.²

Così aree a forte endemia per HBV come l'Africa Sub-sahariana e il Sud-Est asiatico risultano essere anche aree ad elevata incidenza di HCC (>30 casi per 100.000 abitanti/anno), mentre regioni a bassa endemia per HBV come il Nord Europa, l'America

del Nord e l'Oceania, presentano una bassa incidenza di HCC (<3 casi per 100.000 abitanti/anno). In queste aree geografiche, Italia compresa, altri agenti eziologici, quali il virus dell'epatite C (HCV) e il dismetabolismo, svolgono un ruolo rilevante nella patogenesi del danno epatico: circa il 60% degli HCC in Italia insorge in pazienti con cirrosi da HCV. La stretta interdipendenza epidemiologica fra epatopatia e HCC spiega perchè in Giappone, dove l'infezione da HCV ha una prevalenza sovrapponibile a quella degli Stati Uniti ma l'infezione si è diffusa 20-30 anni prima, l'incidenza di HCC sia 8-10 volte superiore rispetto a quella degli USA e abbia registrato una tendenza alla riduzione negli ultimi anni. L'età di insorgenza dell'epatocarcinoma risente sia dell'eziologia che delle differenze geografiche, che potrebbero condizionare le modalità di acquisizione delle infezioni virali, ma anche favorire l'esposizione a fattori pro-oncogenetici (es: aflatossine contaminanti le derrate alimentari); mentre nelle regioni a rischio medio-basso l'età alla diagnosi è compresa tra la quinta e la settima decade, nei paesi ad elevata incidenza (es. Africa, Cina) l'età media si riduce e si registrano con una certa frequenza casi in età da pre-adolescenziale a giovanile.

Secondo una recente stima basata su diverse pubblicazioni, tra cui il rapporto dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS), nel 2009, in Italia, il tasso di mortalità aggiustato per età riferibile ad HCC è stato di 4/100.000 nell'uomo e di 1/100.000 nella donna, con una riduzione rispetto al 2000 rispettivamente del 34% e del 41% ³ (Fig. 2). Dai due grafici si evince che il rapporto incidenza/mortalità annua non si discosta molto dall'unità (circa 1.3), indicando l'elevata letalità a breve termine del tumore. In Italia, la sopravvivenza relativa aggiustata per età a 5 anni dalla diagnosi del paziente con tumore primitivo del fegato è pari al 15%. Come riportato sul *Registro AIRTUM*, tale valore non varia nelle diverse aree del Paese (Fig. 3).

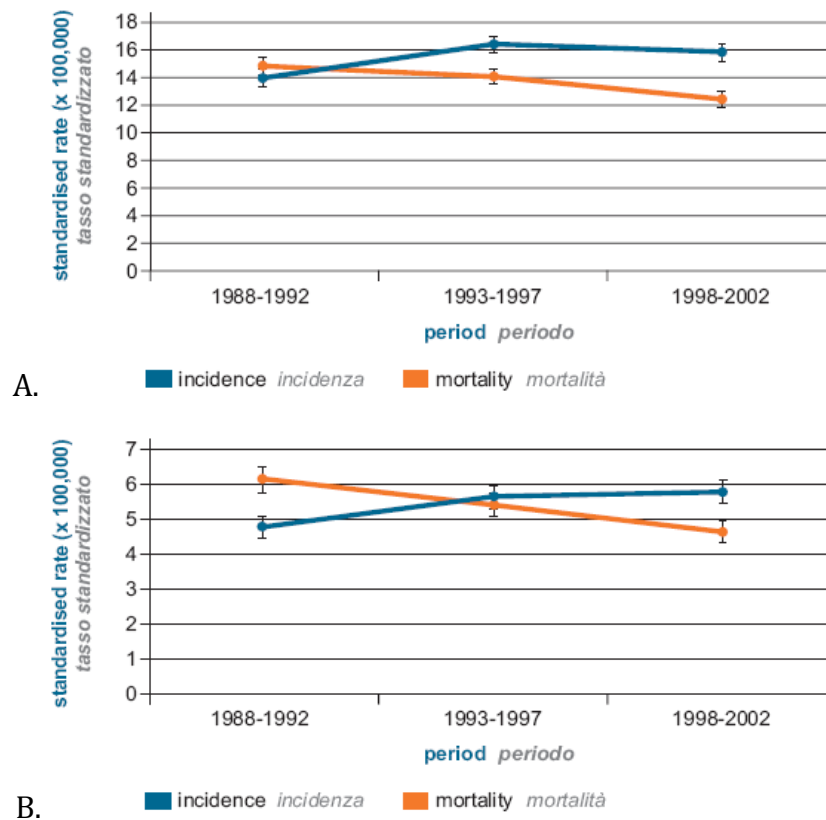


Figura 2. Rapporto incidenza/mortalità negli uomini (A) e nelle donne (B) in Italia.⁴

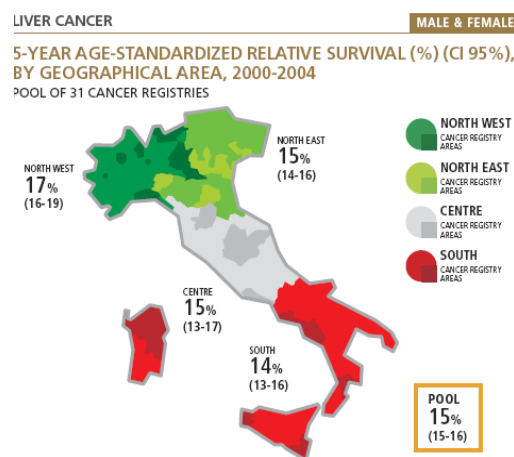


Figura 3. Sopravvivenza relativa aggiustata per età a 5 anni dei pazienti con epatocarcinoma nelle diverse aree geografiche italiane, dal 2000 al 2004 (*Registro AIRTUM*).⁵

2. Epatocarcinogenesi

L'epatocarcinogenesi è un processo multifasico che comporta profonde alterazioni a carico del genoma cellulare^{6, 7} e in cui si possono individuare almeno tre momenti principali: l'induzione, la promozione e la progressione^{8, 9}. Nella prima fase (induzione), la trasformazione maligna dell'epatocita è causata da mutazioni genetiche indotte da un agente iniziante chimico (es. aflatossine, farmaci) o virale (in particolare il virus dell'epatite B, HBV) oppure secondarie ad un aumentato turnover cellulare. Queste mutazioni determinano un'alterata espressione di alcuni proto-oncogeni (ras, myc, fos) e conseguentemente una disregolazione del ciclo cellulare¹⁰⁻¹². Tali modificazioni cellulari sono irreversibili, ma le cellule interessate possono essere rimosse dal fegato attraverso l'apoptosi. La seconda fase (promozione) consiste nella proliferazione delle cellule trasformate, che richiede la presenza di uno stimolo continuo o ripetuto, come ad esempio la persistenza del danno necro-infiammatorio cronico (epatite cronica) associato alla rigenerazione (cirrosi)¹³. La promozione della neoplasia può essere contrastata attraverso l'interferenza di ormoni sessuali, citochine, enzimi (es. l'ornitindecarbossilasi, ODC) o cicline (coinvolte nella proliferazione cellulare)¹⁴. La progressione della carcinogenesi fino alla manifestazione clinica della neoplasia è dovuta all'espansione clonale delle cellule neoplastiche, mediata da fattori di crescita (IGF-2, TGF- α , TGF- β) e favorita da ulteriori mutazioni genetiche coinvolgenti geni tumor suppressor come la p53¹⁵.

Ma da quali cellule origina l'HCC? Da epatociti maturi o da cellule staminali (stem cells)? Molteplici studi di carcinogenesi chimica nei ratti hanno indotto alcuni autori a concludere che l'HCC origina dalla sdifferenziazione di epatociti maturi attraverso vari passaggi^{16, 17}: le cellule che hanno perso la loro polarità epato-specifica a causa della cirrosi rigenerano in modo anarchico e possono andare incontro ad ulteriori modificazioni fenotipiche, definite come displasia epatocitaria, che possono preludere alla trasformazione neoplastica. Esistono inoltre nel fegato cellule staminali (stem cells) che possono dar vita alle due linee cellulari parenchimali del fegato: epatociti e biliociti. Vi sono alcune evidenze che suggeriscono la possibilità che l'HCC origini dalla proliferazione clonale di tali cellule ovali pluripotenti¹⁸.

Il principale fattore di rischio per l'epatocarcinoma è rappresentato quindi dalla cirrosi che si associa al tumore in circa il 90% dei casi (almeno in Italia e nei paesi occidentali). E' definita come una fibrosi diffusa del fegato associata ad una alterazione della normale architettura e vascolarizzazione epatica risultante in noduli rigeneranti con struttura e

vascolarizzazione sproporzionati. I noduli cirrotici contengono epatociti (infetti da virus epatitici quando la causa è virale), cellule infiammatorie che rilasciano linfocine ed altri mediatori che possono contribuire allo sviluppo di cellule neoplastiche derivanti da differenti linee cellulari. La cirrosi può svolgere un duplice ruolo nel processo oncogenetico, sia come fattore inducente che come fattore di promozione. Infatti, l'aumentato turnover cellulare secondario al danno necroinfiammatorio cronico e alla conseguente rigenerazione epatocitaria può contribuire direttamente ad aumentare la frequenza di mutazioni genetiche spontanee e successivamente possono selezionarsi cloni cellulari con caratteristiche di tipo neoplastico. In secondo luogo la stimolazione della proliferazione di cellule “iniziate” può promuoverne l'evoluzione verso la neoplasia conclamata.

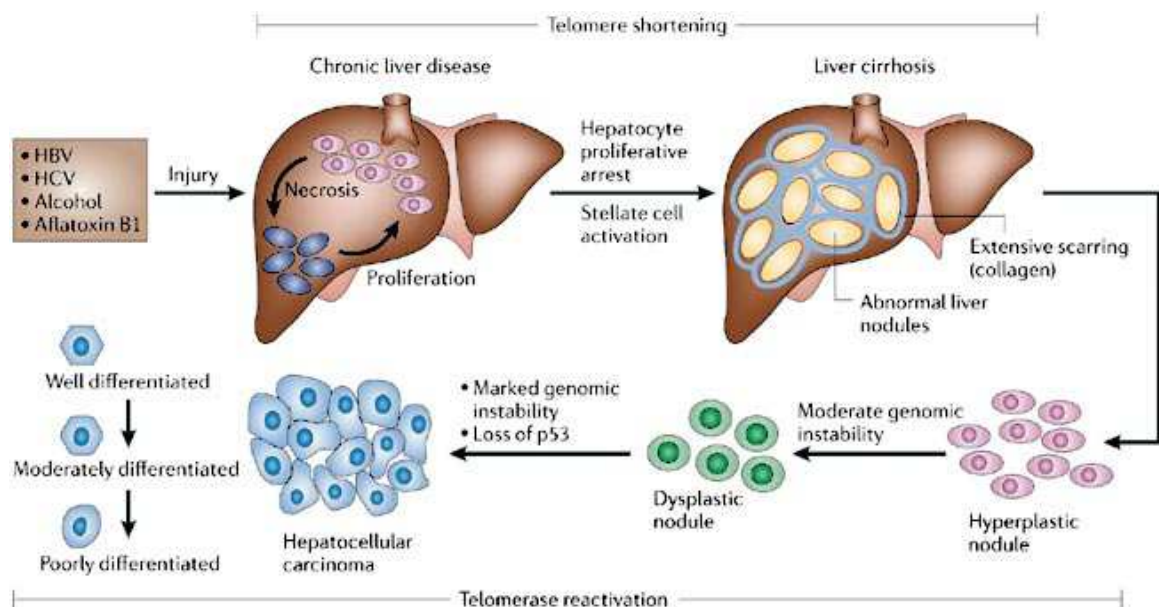


Figura 4. Rappresentazione schematica della patogenesi dell'epatocarcinoma.¹⁹

Nel definire l'eziologia dell'epatocarcinoma bisogna pertanto individuare quelle che sono le cause della cirrosi prevalentemente distinte in virali, da HBV e HCV in quanto virus epatitici cronici, e non virali.

3. Eziologia

3.1 Infezione cronica da HBV

Vi sono ormai molteplici evidenze epidemiologiche, studi di biologia molecolare e sul modello animale, che dimostrano un ruolo diretto del virus dell'epatite B nell'epatocarcinogenesi.

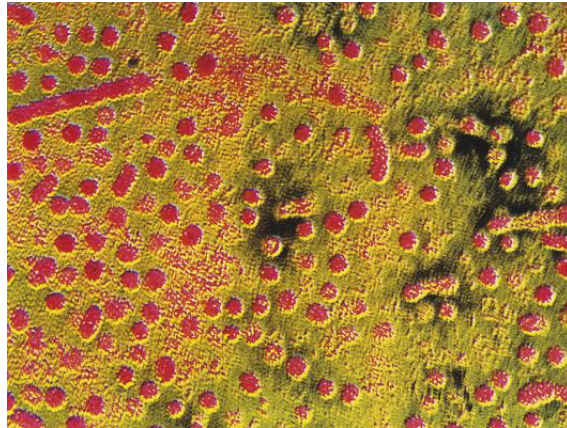


Figura 5. Virus dell'HBV osservato al microscopio elettronico: si evidenziano i diversi tipi di particelle.

L'HBV può indurre mutagenesi e quindi trasformazione neoplastica degli epatociti infetti attraverso diversi meccanismi. L'integrazione dell'HBV-DNA nel DNA cromosomiale²⁰, che avviene in siti discreti e variabili, può causare delezioni, riarrangiamenti o alterazioni di geni coinvolti nella regolazione della proliferazione e della differenziazione cellulare; l'integrazione virale può inoltre verificarsi in corrispondenza o presso proto-oncogeni (nella marmotta è stata dimostrata l'integrazione presso il gene *myc*)²¹⁻²³. L'HBV-DNA contiene inoltre sequenze che codificano per proteine in grado di transattivare geni cellulari: sequenze delle regioni Pre-S/S troncate e della regione X²⁴. Poiché i geni (Open Reading Frame, ORF) relativi a queste proteine sono mantenuti intatti nelle sequenze di HBV-DNA integrato, l'attività transattivante è presente anche negli epatociti con solo HBV-DNA integrato. Tale meccanismo oncogenetico può quindi essere operante anche in soggetti con pregressa infezione da HBV: l'integrazione dell'HBV-DNA avviene infatti già nelle fasi precoci dell'infezione. Infine sequenze di HBV-DNA sono state individuate in epatocarcinomi insorti in pazienti negativi per tutti i marcatori sierologici di infezione da HBV, suggerendo un ruolo dell'infezione da HBV nella patogenesi dell'HCC anche in questi soggetti²⁵, in quanto causa di epatite cronica e cirrosi. *Beasley et al.*,²⁶ in uno studio prospettico controllato, hanno mostrato che l'incidenza annuale di HCC, nei portatori di

epatite B, era dello 0,5% ²⁷. L'incidenza annuale cresce con l'età e giunge a 70 anni all'1%. L'incidenza in pazienti con nota cirrosi è del 2,5%/anno. Il rischio relativo di carcinoma epatocellulare è stato di circa 100, cioè portatori di epatite B avevano una probabilità 100 volte maggiore di sviluppare HCC rispetto all'individuo non infetto. *Sakuma et al.*²⁸ hanno trovato che l'incidenza di carcinoma epatocellulare nei maschi lavoratori delle ferrovie giapponesi era dello 0,4%/anno. In entrambi gli studi le popolazioni erano asiatiche e di sesso maschile, con l'infezione da epatite B probabilmente acquisita alla nascita o nella prima infanzia. Studi prospettici di coorte non controllati in Nordamerica, dove l'epidemiologia dell'epatite B è diversa, in termini di acquisizione più tardiva nella vita, hanno indicato che l'incidenza di carcinoma epatocellulare, nei portatori di HBV, varia ampiamente.²⁹ *Villeneuve et al.*³⁰ non hanno trovato alcun tumore in una coorte di soggetti portatori asintomatici di HBV e seguiti per 16 anni. *McMahon et al.*³¹ ha riportato una incidenza di HCC di 0,26% / anno in uno studio su individui con infezione da HBV in Alaska. *Sherman et al.*²⁹ hanno descritto un'incidenza del 0,46%/anno nel loro gruppo. Le apparenti importanti differenze riscontrate nei diversi studi sono legate a differenze epidemiologiche (diversa età di acquisizione dell'infezione, differenti prevalenze dei genotipi di HBV e possibili differenti genetiche predisponenti legate all'etnia) e alla differente fase di infezione e malattia da HBV. In Europa l'epatocarcinoma nei portatori di epatite B si verifica quasi esclusivamente nei pazienti con cirrosi.³² I portatori cronici caucasici, che sono anti-HBe (anti-Hepatitis B "e" Antigen antibodies) positivi con infezione inattiva, cioè con replicazione virale persistentemente bassa e senza significativa malattia di fegato, hanno un basso rischio di sviluppare HCC^{33, 34} e tale rischio si riduce ulteriormente in coloro che perdono l'HBsAg spontaneamente.³⁵ Pertanto si può dire che nei caucasici il rischio è legato principalmente all'attività infiammatoria e alla presenza di cirrosi, nei soggetti asiatici anche i portatori di HBV senza cirrosi presentano un significativo rischio di carcinoma epatico, che è proporzionale ai livelli replicativi.^{33, 36, 37} Nei soggetti asiatici che perdono l'HBsAg dopo un lungo periodo di infezione il rischio di HCC persiste: questi pazienti devono continuare a sottoporsi ad una stretta sorveglianza.³⁸ Poiché l'incidenza di HCC supera lo 0,2% all'età di 40 anni, gli uomini asiatici dovrebbero sottoporsi a sorveglianza dai 40 anni in poi. Inoltre l'incidenza di carcinoma epatocellulare nelle donne è inferiore a quello degli uomini, anche se molti dati di incidenza età-specifici non sono disponibili e sembra opportuno iniziare la sorveglianza nelle donne asiatiche a circa 50 anni. Tutti i portatori di epatite B con cirrosi, indipendentemente dall'età dovrebbero essere sottoposti a screening per il carcinoma

epatocellulare. In presenza di una storia familiare, di un parente di primo grado con HCC, la sorveglianza deve iniziare in età più giovane rispetto ai 40,³⁹ ma l'efficacia della sorveglianza in tutti i portatori di età inferiore ai 40 anni è probabilmente modesta. Gli Africani con epatite B sembrano avere l'epatocarcinoma ad un'età più giovane,⁴⁰ e questo suggerisce che la sorveglianza in queste popolazioni dovrebbe iniziare in giovane età. Nei caucasici portatori di epatite B senza cirrosi e con infezione inattiva, con ALT persistentemente normali e bassi livelli sierici di HBV-DNA,³² l'incidenza di carcinoma epatocellulare è probabilmente troppo bassa perchè valga la pena di fare una sorveglianza. In questi soggetti, tuttavia, sono da considerare gli ulteriori fattori di rischio: l'età avanzata, la persistenza di replicazione virale e di co-infezione da epatite C o HIV, o la presenza di altre malattie del fegato. Inoltre, pur in assenza di cirrosi, pazienti caucasici adulti con malattia attiva sono a rischio di sviluppare HCC, e dovrebbero essere sottoposti a screening.

Anche il genotipo dell'HBV è un fattore che influenza il rischio di sviluppare l'epatocarcinoma, probabilmente come conseguenza di differenze di durata e della gravità dell'infiammazione epatica nel tempo. Tra i genotipi prevalenti in Europa e Medioriente, il genotipo A si associa ad un esito più favorevole rispetto al D, mentre tra i genotipi "asiatici", il genotipo C presenta un più alto rischio di carcinoma rispetto al genotipo B.⁴¹

42

3.2. Infezione cronica da HCV

Il virus dell'epatite C, essendo causa di epatite cronica e cirrosi, interviene nella fase di promozione dell'epatocarcinogenesi stimolando indirettamente la proliferazione epatocellulare attraverso il processo necroinfiammatorio. Alcune evidenze suggeriscono che l'HCV possa stimolare anche direttamente la proliferazione: è stata infatti riportata l'associazione tra replicazione dell'HCV ed espressione di TGF- α e ILGF II nel fegato cirrotico.⁴³ Non vi sono invece ancora dati sufficienti a dimostrare che l'HCV possa avere un ruolo diretto nella fase di induzione, quale agente in grado di trasformare gli epatociti in cellule neoplastiche.

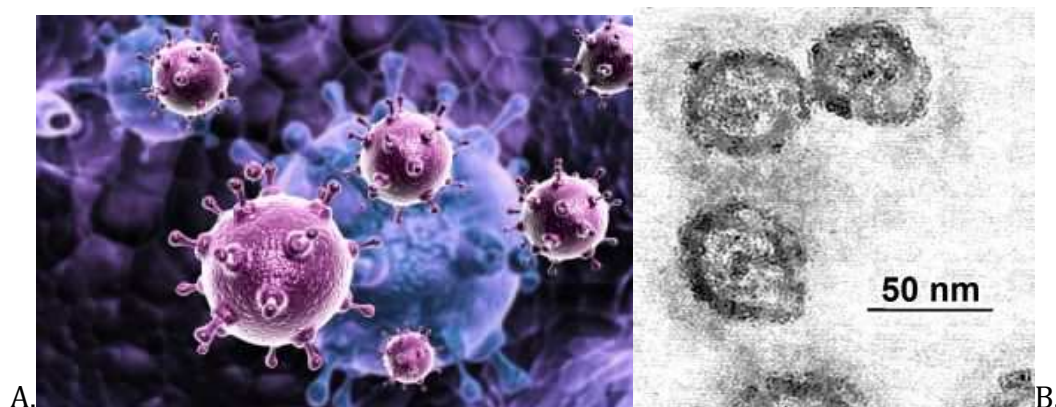


Figura 6. HCV in una rappresentazione tridimensionale (A) e al microscopio elettronico (B).

Negli ultimi anni diversi autori hanno riportato dati sperimentali che suggeriscono una diretta partecipazione dell'HCV nel processo oncogenetico attraverso proprie proteine strutturali e non strutturali. Esperimenti in vitro hanno dimostrato che la proteina core dell'HCV è in grado di trasformare i fibroblasti interagendo con l'oncogene RAS, di sopprimere l'espressione di alcuni geni, di modificare la suscettibilità delle cellule in coltura ai mediatori dell'apoptosi⁴⁴; infine nel topo transgenico essa ha indotto lo sviluppo di HCC⁴⁵. Anche per la proteina NS3 è stata dimostrata la capacità di trasformare i fibroblasti della linea NIH 3T3. Tuttavia i livelli di espressione delle proteine dell'HCV in questi modelli sperimentali sono di gran lunga superiori a quelli usualmente osservabili in vivo, per cui non è possibile valutare se tali attività oncogenetiche siano realmente presenti durante l'infezione naturale da HCV. Il rischio di HCC in pazienti con epatite cronica C è massimo ed è stato meglio studiato in pazienti con cirrosi diagnosticata,⁴⁶ nei quali l'incidenza di HCC è tra il 2% -8% all'anno. Va notato che questi dati provengono da studi, per lo più retrospettivi, basati sulla clinica. Vi è un unico studio prospettico del rischio di HCC in pazienti con epatite C.⁴⁷ In questo studio su una popolazione di 12.008 uomini anti-HCV positivi si conferisce un aumentato rischio, 20 volte superiore, di HCC rispetto a soggetti anti-HCV negativi. La presenza o assenza di cirrosi non è stata valutata. Individui con epatite C non cirrotici hanno un rischio molto più basso di sviluppare l'epatocarcinoma.

1.3.3 Fattori non virali

L'incidenza di epatocarcinoma su cirrosi causata da malattie diverse dall'epatite virale, non è stata ad oggi puntualmente stimata. L'alcol rappresenta un fattore di rischio per HCC in quanto causa di danno epatico e cirrosi. La cirrosi alcolica presenta una prevalenza significativa tra i pazienti con HCC (32-35% in due studi di *Schonger-Hekele* del 2000 e di

Hassan del 2002),^{48,49} tuttavia è difficile determinare l'incidenza annua di HCC in questi pazienti, in quanto la maggior parte degli studi è stata condotta precedentemente all'identificazione dell'HCV, ed è noto che l'epatite C è relativamente frequente negli alcolisti.⁵⁰

Con il riconoscimento della steatoepatite come causa di cirrosi, si è ipotizzato che anche questo potesse essere un fattore di rischio per il carcinoma epatocellulare. E' definita microscopicamente e consiste nella presenza di steatosi e di una forma specifica di danno epatocellulare, parenchimale e di infiammazione portale, e di gradi variabili di fibrosi con possibilità di progressione verso la cirrosi⁵¹ (Fig. 7).

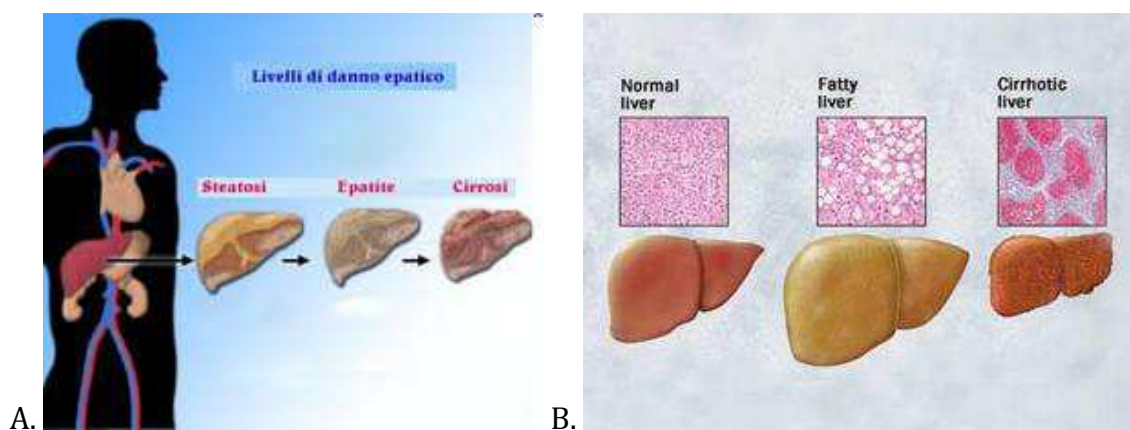


Figura 7. Raffigurazione dell'evoluzione del danno epatico: dalla steatosi alla cirrosi (A), e rispettivo aspetto al microscopio ottico (B).

Mentre la maggior parte dei soggetti con steatosi epatica non alcolica (NAFLD) hanno isolata steatosi, circa il 20% di tutti i casi si presentano come steatoepatite, che è stata anche descritta in coorti di pazienti con HCC.⁵² Nessuno studio finora ha seguito un gruppo di questi pazienti sufficientemente ampio, per un tempo sufficiente a descrivere un tasso di incidenza di carcinoma epatocellulare. La steatoepatite è la manifestazione epatica dell'obesità e di disturbi metabolici correlati come l'alterato metabolismo glucidico e il diabete. Questa associazione è allarmante a causa dell'elevata prevalenza a livello mondiale di queste condizioni, che possono contribuire alla crescente incidenza di HCC, testimoniata in molti paesi industrializzati. In uno studio di coorte di pazienti con diabete, il diabete è stato trovato nel 20% dei casi come unico fattore di rischio per HCC⁵³. Non era descritta la prevalenza di cirrosi in questo studio. Diversi studi epidemiologici su vasta scala hanno associato il sovrappeso e l'obesità, sempre più diffusi, con un rischio più elevato di epatocarcinoma.⁵⁴ In una coorte di 900.000 adulti americani, il rischio di morire

di cancro al fegato era 4,5 volte superiore negli uomini con un indice di massa corporea di 35 kg/m² o superiore, rispetto al gruppo di riferimento con un indice di massa corporea normale (18,5-24,9 kg/m²)⁵⁴. Una recente meta-analisi ha concluso che il rischio relativo sommario di cancro al fegato era 117% per soggetti in sovrappeso e 189% per quelli obesi⁵⁵. La NAFLD è fortemente legata all'obesità e caratterizzata da iperglicemia, insulino-resistenza e iperinsulinemia, ed è stata associata con un aumento del rischio di diversi tumori⁵⁶. Prove sostanziali indicano che il diabete promuove lo sviluppo e la progressione di HCC⁵⁷. Il diabete nella maggior parte degli individui può esistere anche per lungo tempo prima della diagnosi di HCC e ci sono interazioni sinergiche tra questo ed altri fattori di rischio di HCC,⁵⁸⁻⁶⁰ come l'epatite cronica C e il danno epatico alcolico. Inoltre, l'HCC può complicare la NAFLD in soggetti non cirrotici, con lieve o assente fibrosi, ampliando enormemente la popolazione potenzialmente a più alto rischio. I principali meccanismi molecolari e sistemici fegato-specifico coinvolti comprendono l'insulino-resistenza e l'iperinsulinemia, l'aumento del TNF nelle vie di segnalazione, e le alterazioni del metabolismo cellulare dei lipidi. Questi forniscono nuovi bersagli per la prevenzione, il riconoscimento precoce, ed il trattamento efficace del carcinoma epatocellulare associato con la NAFLD.⁶¹

I pazienti affetti da emocromatosi genetica (GH) con cirrosi hanno un aumentato rischio di HCC.^{62, 63} Il rischio relativo di carcinoma epatocellulare è di circa 20. Il tasso di incidenza standardizzato per HCC nella cirrosi da GH è 92,9 (intervallo di confidenza 95% [CI] 25-237,9). L'incidenza di epatocarcinoma in cirrosi a causa di GH è sufficientemente elevata (circa il 3-4% /anno) per cui questi pazienti devono essere inseriti in programmi di sorveglianza. Nella cirrosi biliare primaria stadio 4, è stata riportata n'incidenza di HCC all'incirca simile a quella della cirrosi da epatite C.⁶⁴ Per la cirrosi da alfa 1-antitripsina (AAT),⁶⁵ o da epatite autoimmune non esistono dati sufficienti, provenienti da studi di coorte, per valutare con precisione l'incidenza di HCC.

4. Prevenzione

In considerazione dei diversi fattori di rischio noti per l'epatocarcinoma, per abbattere l'incidenza di HCC occorre intervenire su diversi livelli:

1. Prevenzione dell'infezione da HBV attraverso la vaccinazione. L'esperienza di Taiwan costituisce la prima evidenza che la vaccinazione anti-epatite B permetta la prevenzione dell'epatocarcinoma (Fig. 8)⁶⁶. Oltre che prevenire l'infezione e la malattia da HBV in soggetti sani, la vaccinazione anti-epatite B può limitare il rischio oncogenetico HBV correlato anche in soggetti con epatopatia cronica da altra eziologia (ad esempio nei pazienti con epatite cronica C).

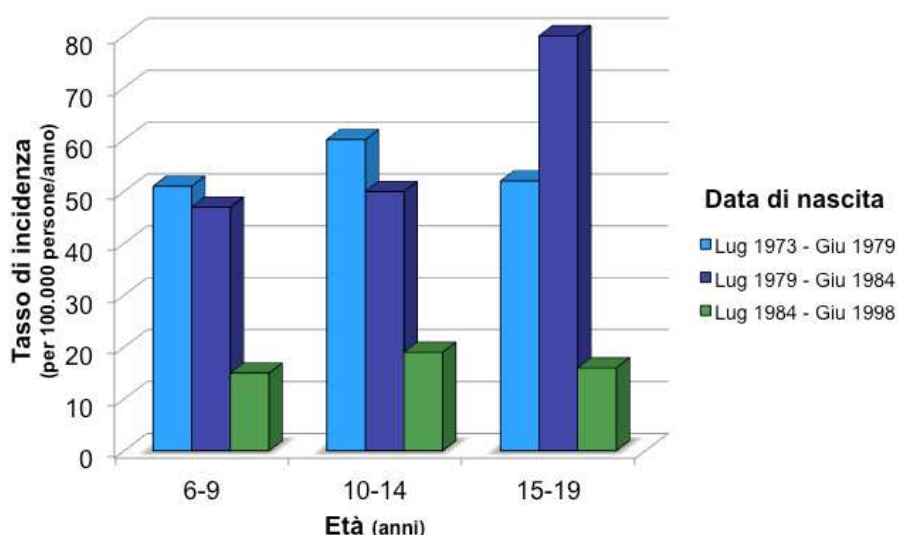


Figura 8. Tasso di incidenza del carcinoma epatocellulare in Taiwan diagnosticato nel periodo tra il 1983 e il 2004 tra i giovani che avevano 6-9, 10-14, 15-19 anni e sono nati prima dell'introduzione del programma vaccinale contro HBV introdotto il 1 Luglio 1984.⁶⁶

2. Prevenzione della cronicizzazione dell'infezione e della malattia da virus epatitici, attraverso il trattamento antivirale precoce dopo l'epatite acuta. Nell'adulto ciò è valido soprattutto nei soggetti con epatite acuta da HCV, che presenta tassi di cronicizzazione elevati, attorno al 50%, mentre l'epatite B cronicizza in circa il 5% dei casi. Attualmente non vi è tuttavia un pieno consenso sul trattamento del paziente con epatite virale acuta.
3. Trattamento dei soggetti con epatite cronica per evitare l'evoluzione cirrotica. Lo spegnimento della lesione necroinfiammatoria nella fase dell'epatite cronica sembra in grado di prevenire lo sviluppo di cirrosi e di HCC⁶⁷.

4. Nei soggetti con epatite cronica virale che hanno già sviluppato la cirrosi, il trattamento con interferone può ridurre l'attività necroinfiammatoria e lo stimolo proliferativo. Non vi sono al momento studi prospettici che abbiano documentato in modo definitivo che tale trattamento possa ridurre l'incidenza di epatocarcinoma. Il trattamento con interferone può ridurre l'incidenza (o comunque ritardare lo sviluppo) dell'HCC in soggetti con cirrosi da HCV senza pregressa esposizione all'HBV. Nei soggetti con infezione da HBV in corso o pregressa il trattamento con interferone deve essere effettuato precocemente, prima che si sia instaurata la cirrosi.

4.1 Trattamento dell'epatite virale cronica

L'epatite B. Non vi sono ancora evidenze definitive che il trattamento con interferone dell'epatite cronica B riduca l'incidenza di carcinoma epatocellulare. Studi europei hanno suggerito che la terapia con interferone per l'epatite cronica B abbia migliorato la sopravvivenza e ridotto l'incidenza di HCC.⁶⁸ Uno studio del Taiwan ha inoltre indicato che la terapia di successo con interferone, vale a dire con sieroconversione ad anti-HBe, è stata associata con una ridotta incidenza di HCC.⁶⁹ Tuttavia, in questi studi, il tasso di eventi era basso, e le dimensioni del campione erano relativamente piccole. Al contrario, uno studio non-randomizzato, caso controllo condotta ad Hong Kong, che comprendeva una coorte più ampia seguita per lunghi periodi, ha riportato una incidenza di carcinoma epatocellulare simile nei trattati e nei non trattati.⁷⁰ Un trial clinico randomizzato RCT suggerisce che la Lamivudina nel trattamento dei portatori di epatite B con cirrosi, non riduca l'incidenza di carcinoma epatocellulare;⁷¹ mentre un successivo studio di Kumada et al. ha evidenziato che il trattamento con analoghi nucleos(t)idici riduce il rischio di HCC.⁷² Se un paziente è un candidato per la sorveglianza prima dell'istituzione della terapia, sembra prudente continuare ad offrire la sorveglianza anche dopo la sieroconversione o la remissione dell'attività infiammatoria indotta dalla terapia.

Epatite C. Sono disponibili diversi studi che hanno valutato l'effetto del trattamento dell'epatite cronica C sull'incidenza di HCC. Un unico RCT in Giappone ha suggerito che l'incidenza di HCC è stata ridotta in entrambi i “responders” e i “non responders” all'interferone.⁷³ Questi risultati non sono poi confermati in un secondo RCT condotto in Francia.⁷⁴ I risultati di questi studi sono stati riassunti in una meta-analisi, che ha concluso che il beneficio è visto soprattutto in coloro che sono stati trattati con successo, ad esempio, chi ha avuto una risposta virologica sostenuta, e anche allora, l'effetto era

comunque minimo.⁷⁵ Una serie di studi in Giappone ha confrontato l'incidenza di carcinoma epatocellulare in pazienti trattati, con gli “historical controls”.^{76, 77} Questi hanno suggerito che esiste una ridotta incidenza di HCC nei pazienti trattati. Tuttavia, i dati non dimostrano che il trattare o sradicare l'epatite C elimini completamente il rischio di HCC. Sembra quindi che i pazienti con epatite C e cirrosi che hanno raggiunto la clearance virale in terapia dovrebbero, almeno per ora, continuare a sottoporsi a sorveglianza.

Si noti che i pazienti trattati o spontaneamente inattivati con epatite cronica B o C, possono mostrare una regressione della fibrosi sufficiente per suggerire un'inversione di cirrosi. Il rischio di epatocarcinoma in questi pazienti probabilmente non diminuisce proporzionalmente con il miglioramento della fibrosi. Ci sono molte teorie circa la patogenesi del carcinoma epatocellulare in questi pazienti, ma un fattore comune sembra essere il ripetersi di cicli di necrosi e rigenerazione. I passi necessari per avviare il percorso cancerogeno probabilmente si verificano molti anni prima che la malattia diventa inattiva, e così la possibilità di sviluppare la neoplasia rimane anche se la fibrosi diminuisce; per cui la regressione della fibrosi non è un motivo per rifiutare o terminare il processo di sorveglianza. I pazienti che riescono ad eliminare il virus prima di sviluppare la cirrosi hanno un rischio molto basso di sviluppare l'epatocarcinoma e quindi non viene loro garantita la sorveglianza.

4.2 Sorveglianza del carcinoma epatocellulare

La sorveglianza per l'HCC si svolge applicando un test di screening. Il processo di sorveglianza prevede la valutazione del livello di rischio di HCC tale da far scattare la sorveglianza, quali test di screening applicare e la frequenza (intervallo di sorveglianza), e come i risultati anomali dovrebbero essere trattati (diagnosi e/o richiamo).

La sorveglianza per HCC è stata ampiamente applicata. La decisione di far rientrare un paziente in un programma di sorveglianza è determinata dal suo livello di rischio per l'epatocarcinoma; per cui si consiglia di applicarla ai gruppi di pazienti riportati nella Tabella 1.

Tabella 1. La sorveglianza è consigliata per i seguenti gruppi di pazienti.

Portatori di epatite B

Maschi asiatici > 40 anni

Femmine asiatiche > 50 anni

Tutti i portatori cirrotici di epatite B

Storia familiare di carcinoma epatocellulare

Africani di età superiore ai 20

Per i portatori di epatite B non cirrotici non elencati sopra il rischio di HCC varia a seconda della gravità della malattia epatica di base, e dell'attività infiammatoria epatica attuale e passata. I pazienti con elevate concentrazioni di DNA di HBV e quelli con attività infiammatoria epatica in corso rimangono a rischio di HCC.

Cirrosi non da epatite B

Epatite C

Cirrosi alcolica

Emocromatosi genetica

Cirrosi biliare primaria

Anche se i seguenti gruppi hanno un aumentato rischio di carcinoma epatocellulare non possono essere fatte raccomandazioni a favore o contro la sorveglianza a causa della mancanza di dati che impedisce di valutare se la sorveglianza sarebbe utile.

Alfa1-antitripsina

Steatoepatite non alcolica

Epatite autoimmune

Classificando meglio i gruppi di pazienti distinguiamo:

- Pazienti con cirrosi in classe A o B di Child-Pugh;
- Pazienti con cirrosi in classe C di Child-Pugh in attesa di trapianto di fegato;
- Pazienti non-cirrotici con epatite cronica o malattia inattiva HBV e viremia >10000 copie /ml;
- Pazienti non-cirrotici con epatite cronica HCV e fibrosi epatica \geq F3 Metavir (o \geq 10 Kpa all'elastografia [Fibroscan®]);
- Pazienti non-cirrotici con epatite cronica HCV ed almeno uno dei seguenti fattori addizionali di rischio: età \geq 55 anni se maschi o \geq 65 anni se femmine, storia familiare di HCC, co-infezione HBV e/o HIV, abuso alcolico, alfa1-fetoproteina elevata, diabete, obesità;
- Pazienti con epatite cronica HBV o HCV, trattati con successo (viremia negativa a 6 mesi dal termine del trattamento), ma con almeno uno dei seguenti fattori addizionali di rischio: età \geq 55 anni se maschi o \geq 65 anni se femmine, storia familiare di HCC, abuso alcolico, alfa1-fetoproteina elevata, diabete/obesità, fibrosi epatica F3-F4 Metavir pre-trattamento, ridotta conta piastrinica pre-trattamento.

Nota bene: condizione essenziale per tutte le categorie di pazienti sopra elencate è quella di non presentare controindicazioni al trattamento radicale o palliativo efficace dell'HCC.⁵

Vi è un unico studio randomizzato controllato di sorveglianza versus non sorveglianza, che ha mostrato un beneficio sulla sopravvivenza con una strategia di sorveglianza a 6 mesi con alfa-fetoproteina (AFP) e ultrasuoni.⁷⁸ Questo studio, che è stato eseguito in Cina, ha reclutato 18.816 pazienti che avevano marcatori di infezione da epatite B in corso o precedente. Il rispetto della sorveglianza non è stato ottimale (meno del 60%), ma nei soggetti del braccio di sorveglianza la mortalità per carcinoma epatico è stata ridotta del 37%. Questi risultati rappresentano probabilmente la prestazione minima che ci si può aspettare dalla sorveglianza, a causa della scarsa compliance. Di contro, un precedente studio, condotto anch'esso in Cina, non ha dimostrato benefici, in gran parte perché i pazienti che hanno avuto una diagnosi di HCC non hanno subito un trattamento

appropriato.⁷⁹ Idealmente, questi risultati devono essere convalidati in altre aree geografiche e quindi ulteriori studi randomizzati e controllati (RCT) sono ancora considerati necessari per valutare i benefici della sorveglianza. Tali prove sarebbero difficili da intraprendere, ma sono essenziali per determinare in modo inequivocabile il beneficio di sorveglianza nel ridurre la mortalità per carcinoma epatocellulare. L'obiettivo che ci si pone è quindi quello di ridurre la mortalità per la malattia, e ove ciò non fosse possibile, la sorveglianza deve fornire un miglioramento significativo della durata e della qualità della sopravvivenza. Altri parametri come il rilevamento più precoce della patologia e i tassi di mortalità a 5 anni, non sono adeguati parametri sostitutivi. Questo è stato chiaramente evidenziato dall'analisi della Sorveglianza Epidemiologica e End Results (SEER) del programma del National Cancer Institute (NCI), che ha dimostrato come questi endpoint non fossero correlati con una riduzione della mortalità malattia-specifica.⁸⁰

Ciò nonostante questi modelli hanno diversi risultati in comune. Tutti dimostrano che la sorveglianza è cost-effective, anche se in alcuni casi è solo marginalmente così, e la maggior parte trova che l'efficacia della sorveglianza sia fortemente dipendente dall'incidenza del carcinoma epatocellulare. Per esempio, *Sarasin et al.*⁸¹ hanno studiato una coorte teorica di pazienti con cirrosi e Child-Pugh A, e hanno scoperto che se l'incidenza di HCC era di 1,5%/anno, la sorveglianza comportava un aumento della longevità di circa 3 mesi. Tuttavia, se l'incidenza di HCC era del 6% l'aumento della sopravvivenza era di circa 9 mesi. Questo studio però, non ha incluso il trapianto come opzione di trattamento. *Arguedas et al.*,⁸² usando una simile analisi, che ha incluso il trapianto di fegato, in una popolazione di pazienti affetti da epatite C con cirrosi e normale funzione epatica, ha scoperto che la sorveglianza, sia con la scansione TC da sola che con la TC e l'ecografia, diventava cost-effective quando l'incidenza di HCC era maggiore dell'1,4%. Tuttavia, questo studio deve essere interpretato con cautela, perché le caratteristiche prestazionali della TC sono state ricavate da studi diagnostici, non da studi di sorveglianza. *Lin et al.*⁸³ hanno trovato che la sorveglianza con AFP ed ecografia era cost-effective indipendentemente dall'incidenza di HCC. Così, per i pazienti con cirrosi di varia eziologia, la sorveglianza dovrebbe essere offerta quando il rischio di HCC è di 1,5%/anno o più. La Tabella 1 descrive i gruppi di pazienti nei quali tali limiti vengono superati.

Le suddette analisi costo-efficacia, che erano limitate alle popolazioni dei cirrotici, non possono essere applicate ai portatori di epatite B senza cirrosi. Questi pazienti, in particolare in Asia e in Africa, sono anch'essi a rischio di HCC. Un'analisi cost-effective

della sorveglianza di portatori di epatite B, e che utilizzano gli ultrasuoni e i livelli di AFP, ha suggerito che la sorveglianza diventa importante una volta che l'incidenza di HCC ha superato lo 0,2%/anno (*Collier J e Sherman M*, osservazioni non pubblicate).

L'EASL conference ha suggerito che la sorveglianza debba essere rivolta ai pazienti con epatite C e cirrosi o con fibrosi epatica severa (a ponte) o in evoluzione cirrotica. Il costo-efficacia di questa raccomandazione non è stato valutato. Sulla base delle conoscenze attuali, tutti i pazienti con epatite C e cirrosi dovrebbero essere sottoposti a sorveglianza. Se debbano essere sottoposti a sorveglianza anche i pazienti con fibrosi a ponte, rimane controverso.

I pazienti che sono co-infettati con HIV e l'epatite B o epatite C, possono avere più rapidamente progressione di malattia di fegato⁸⁴ e quando raggiungono la cirrosi sono anche a rischio aumentato di HCC.^{85, 86} Lo studio MORTAVIC ha indicato che HCC era responsabile del 25% di tutte le morti di fegato nell'era post-HAART.⁸⁷ I criteri per l'inserimento dei pazienti co-infettati in programmi di screening HCC sono gli stessi per i pazienti mono-infettati, cioè, quelli basati sullo stadio e grado della malattia epatica.

Per quanto riguarda i cofattori non virali di rischio dell'HCC, dal momento che l'incidenza di epatocarcinoma nella cirrosi da NAFLD è sconosciuta, non è possibile valutare se la sorveglianza possa essere efficace o cost-effective. Nessuna raccomandazione può essere indicata sul fatto che questo gruppo debba essere sottoposto, o meno, a screening per il carcinoma epatocellulare. Ciò non esclude la possibilità che la sorveglianza sia utile in questi individui, e dati futuri potrebbero cambiare questa raccomandazione.

4.2.1. Altri fattori predittivi di HCC

Sono stati fatti diversi tentativi di sviluppare marcatori non-invasivi per predire lo stadio della fibrosi⁸⁸, e se opportunamente validati, questi potrebbero essere usati per determinare quando avviare la sorveglianza. Allo stesso modo, molti altri marcatori possono prevedere un significativo rischio di HCC. Questi includono una concentrazione elevata di alfa-fetoproteina (AFP),⁸⁹ la presenza di noduli macrorigenerativi,⁹⁰ di piccole e grandi displasie cellulari alla biopsia,⁹¹ di rigenerazione irregolare (noduli di rigenerazione con margini irregolari)⁹² e di un indice maggiore di marcatura per l'antigene nucleare delle cellule proliferanti o la colorazione d'argento della regione nucleolare.^{93, 94} o più semplicemente il numero di piastrine. È stato suggerito che l'incidenza di HCC in pazienti cirrotici con epatite C aumenta solo sostanzialmente una volta che la conta piastrinica è inferiore a $100 \times 10^9/L$,^{46, 95, 96} indipendentemente dalla funzione epatica. Altri hanno

tentato di sviluppare indici predittivi basati su pannelli delle prove sierologiche comunemente eseguite come alfa 2-macroglobulina, apolipoproteina A1, aptoglobina, bilirubina e gamma-glutamyl-transpeptidasi e la AST/ALT ratio.⁸⁸ Tuttavia, questi indici devono ancora essere convalidati prima di entrare in un uso generale e non possono essere raccomandati in questo momento.

Il test radiologico più utilizzato per la sorveglianza è l'ecografia. Un piccolo HCC agli ultrasuoni può apparire in diversi modi. Le piccole lesioni possono essere ecogene, a causa dell'accumulo intracellulare di lipidi. Altre lesioni possono essere ipoecogene, o mostrarsi come una apparente "lesione target". Nessuno di questi aspetti con cui si presenta è specifico. L'ecografia ha una sensibilità tra il 65% e il 80%, e una specificità superiore al 90%, se utilizzata come test di screening.⁹⁷ Tuttavia, le caratteristiche di performance non sono state così definite nei fegati cirrotici nodulari sottoposti a sorveglianza^{98, 99} Queste caratteristiche di performance, anche se non sono l'ideale, sono superiori a qualsiasi test sierologico. Il principale svantaggio degli ultrasuoni per la sorveglianza dell'HCC, è che sono molto operatore-dipendente. Inoltre, la scansione è difficile nei soggetti obesi. Idealmente, gli "ultrasonographers" per la sorveglianza dell'HCC dovrebbero ricevere una formazione specifica, tanto quanto si fa per la sorveglianza mammografica in alcune giurisdizioni.



Figura 9. Ecografia con mezzo di contrasto che evidenzia il pattern vascolare della lesione indicata dalla freccia bianca.

Strategie come l'alternare il dosaggio dell'AFP e l'ecografia ad intervalli regolari, non hanno alcun fondamento.

4.2.2. Intervallo di sorveglianza

L'intervallo di sorveglianza è di 6 mesi,¹⁰⁰ ed è determinato dai tassi di crescita del tumore, non dal grado di rischio come si potrebbe pensare. Questo è importante perché significa che l'intervallo di sorveglianza non necessita di essere accorciato per i pazienti che si pensa essere a rischio più elevato. Tuttavia, è importante fare la distinzione tra i pazienti sottoposti a sorveglianza, cioè quelli in cui, anche se l'alto rischio viene riconosciuto, non hanno alcuna ragione a priori per sospettare la presenza dell'HCC, e quelli in cui le prove di sorveglianza sono risultate anomale e quindi vi è la preoccupazione che l'HCC sia già presente. Tali pazienti dovrebbero ricevere un follow-up maggiore.

Un più stretto monitoraggio deve essere impostato in soggetti con evidenza di accrescimento della lesione focale epatica, anche se precedentemente definita benigna, o nel caso di lesione focale di nuovo riscontro non caratterizzabile, ciò in genere riguarda le lesioni di piccole dimensioni ($\leq 1\text{cm}$).

In conclusione la sorveglianza per HCC, attivata con il controllo ecografico semestrale trova indicazione in tutti i pazienti cirrotici (indipendentemente dall'eziologia) e in alcune categorie di portatori di infezione da HBV e/o HCV a più elevato rischio (Tabella 1).

5. Diagnosi

Le indagini utilizzate per la diagnosi di HCC comprendono gli esami radiologici (Ecografia, TC e RM), la biopsia e la sierologia con il dosaggio dell'AFP.

Inoltre TC o RM sono sempre necessarie per determinare lo stadio di malattia. Nell'inquadramento di un paziente con cirrosi epatica di qualunque eziologia, una lesione focale epatica trovata incidentalmente o durante lo screening ecografico ha un alto rischio di essere un epatocarcinoma. La sequenza di indagini utilizzate per la diagnosi di HCC dipende dalla dimensione della lesione.

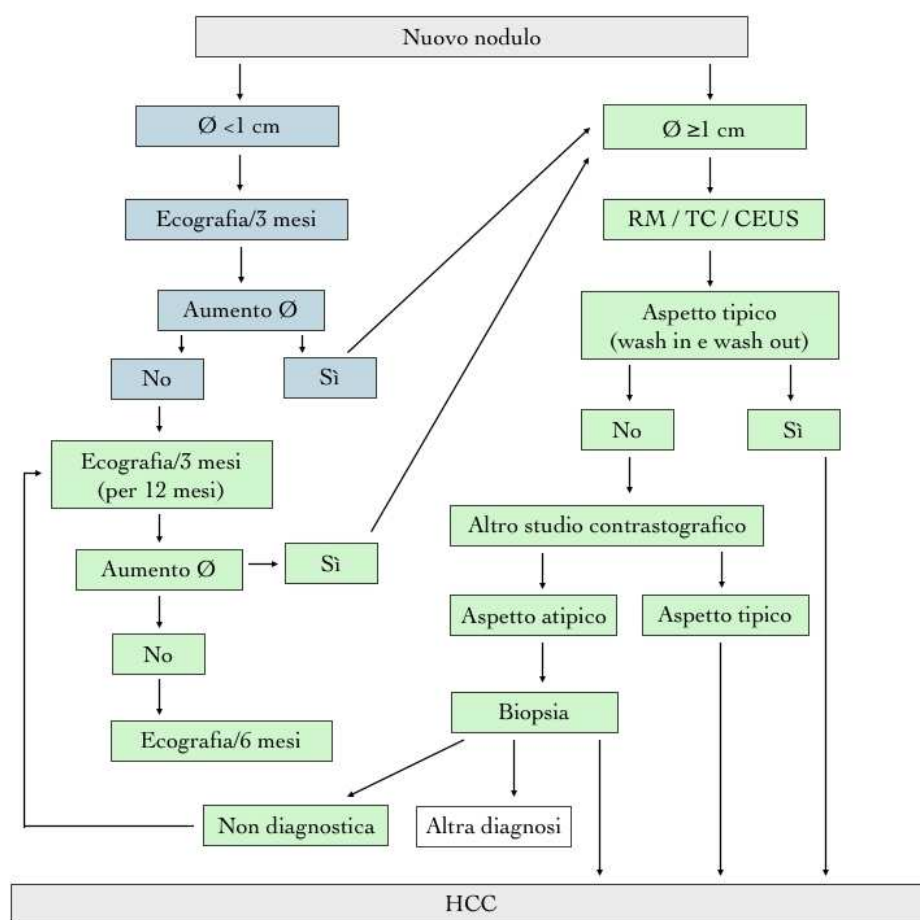


Figura 10. Strategia diagnostica suggerita dopo il rilevamento di un nodulo epatico mediante gli ultrasuoni.⁵

5.1 Ruolo dell'AFP nella diagnosi

L'alfa-fetoproteina è stata a lungo utilizzata per la diagnosi di HCC. Tuttavia, non è sufficientemente sensibile o specifica quando usata per la sorveglianza. Dati recenti suggeriscono che il suo uso come test diagnostico è meno specifico di quello che si pensava. L'AFP può infatti essere elevata anche nel colangiocarcinoma intraepatico (ICC) e in alcune metastasi da neoplasia del colon.¹⁰¹ Pertanto, l'individuazione di una lesione nel fegato associata ad una elevazione dell'AFP non indica necessariamente la presenza di un epatocarcinoma. L'ICC è quindi più comune nei cirrotici piuttosto che nei non cirrotici. Sebbene l'incidenza di ICC sia di gran lunga inferiore all'HCC, il fatto che entrambi siano più comuni nella cirrosi significa che bisogna distinguere attentamente le due neoplasie in virtù delle loro differenze di trattamento e degli esiti. Il fatto che l'AFP possa essere elevata in entrambe le condizioni fa sì che non venga, di fatto, più utilizzata. Di conseguenza, la diagnosi di HCC deve basarsi sull'imaging e sull'istologia.

5.2 La diagnosi radiologica del carcinoma epatocellulare

Sulla base di un riscontro ecografico di lesioni focali epatiche, insorte durante un processo di sorveglianza, occasionale o secondario alla presenza di sintomi, di dimensioni inferiori ad 1cm si raccomanda un follow up ecografico ogni 3 mesi per valutare un eventuale aumento dimensionale. Qualora non si verificasse nell'arco di un anno si può allargare l'intervallo di sorveglianza a 6 mesi. Se si riscontra invece un aumento dimensionale allora è necessario ricorrere ad indagini di secondo livello come TC e/o RM.

L'epatocarcinoma può essere diagnosticato radiologicamente, senza la necessità di biopsia, se sono presenti le caratteristiche tipiche all'imaging.¹⁰² Ciò richiede uno studio con mezzo di contrasto (TC o RM). Poiché l'apporto di sangue alla lesione neoplastica è esclusivamente di tipo arterioso, lo studio radiologico dell'HCC mette in evidenza un'importante enhancement di mezzo di contrasto nella fase arteriosa rispetto al parenchima epatico circostante. Nella fase portale, invece, l'HCC dismette più rapidamente il mezzo di contrasto rispetto al restante parenchima proprio il fatto che il sangue arterioso non contiene più il mezzo di contrasto visto il suo mancato apporto venoso portale. Questo è noto come "washout" sebbene il termine non descriva la sequenza di eventi. Nella fase ritardata, la presenza di "washout" persiste, e talvolta il "washout" è presente solo nella fase ritardata. La presenza di captazione arteriosa di mezzo di contrasto seguita da washout è altamente specifica per HCC.^{103, 104} Così, per documentare adeguatamente l'esistenza dell'epatocarcinoma, è necessario uno studio in 4 fasi: basale, arteriosa, venosa e ritardata (Fig. 11).

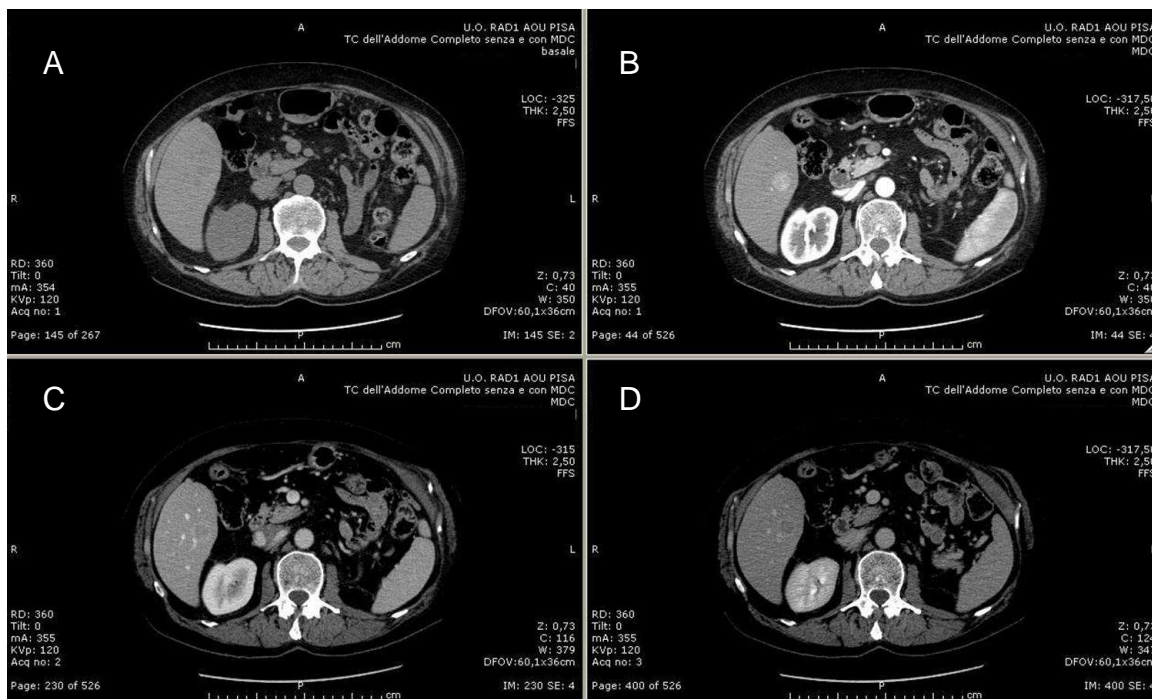


Figura 11. Acquisizione TC basale (A) e dopo somministrazione di mezzo di contrasto. Si evidenzia l'ipervascolarizzazione della lesione in fase arteriosa (B) e il successivo washout in fase porto-venosa (C) e tardiva (D), con persistenza di "ring" di vascularizzazione della capsula.

La RM è preferibile alla TC, in quanto possiede una sensibilità superiore per lesioni epatiche <2 cm.¹⁰⁵ La valutazione dell'estensione intra-epatica del tumore deve essere effettuata preferenzialmente con la RM epatica in quanto è una metodica più accurata della TC, seppure più costosa.

Un ulteriore vantaggio derivante dall'impiego della RM è l'assenza di radioesposizione, aspetto particolarmente rilevante nel caso in cui si prevedono controlli frequenti con questo tipo di indagini. Tuttavia, il Comitato dell'AISF (Associazione Italiana Studio del Fegato) suggerisce l'impiego della TC come indagine di prima linea qualora il ricorso alla RM ritardi il completamento dell'iter diagnostico e la stadiazione, a causa della minore diffusione di apparecchiature adeguate e, nelle sedi in cui siano disponibili, la minore accessibilità a tale metodica. Da considerare l'uso della TC anche per il paziente claustrofobico.

Sono stati presentati algoritmi diversi¹⁰⁶ per la diagnosi di HCC a seconda delle dimensioni della lesione (Fig. 10). Questi algoritmi in gran parte erano basati sull'opinione di esperti, e sulle caratteristiche tipiche di contrasto degli studi radiologici dell'HCC come descritto sopra. Per le lesioni tra 1-2 cm l'algoritmo è stato parzialmente convalidato. *Forner e al.*¹⁰⁴ hanno utilizzato l'ecografia con mezzo di contrasto e la risonanza magnetica per valutare le lesioni più piccole di 2 cm trovate durante il processo di sorveglianza. Il valore predittivo

positivo utilizzando queste due indagini è stato del 100%, sebbene il valore predittivo negativo solo circa il 42%. Questo significa che se entrambi i test sono risultati positivi, la lesione è sicuramente un epatocarcinoma. Tuttavia, se uno o entrambi i test non sono stati conclusivi, allora il tasso di falsi negativi di rilevazione dell'HCC è superiore al 50%.

L'algoritmo richiede che in queste circostanze sia eseguita una biopsia. In questo studio, sono state eseguite fino a tre biopsie per tentare di arrivare alla diagnosi corretta. L'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) non è disponibile negli Stati Uniti, così questi risultati non sono applicabili alla popolazione nord americana. Un secondo studio è arrivato a conclusioni simili,¹⁰⁷ per una validazione esterna dell'algoritmo. Un terzo studio, ha usato la TC, l'ecografia con mezzo di contrasto, e la risonanza magnetica, e quindi ha convalidato l'algoritmo. Queste analisi hanno dimostrato che utilizzando un'unica modalità con mezzo di contrasto si aveva un valore predittivo positivo minore rispetto a quando si utilizzano due metodiche d'indagine, sebbene il valore predittivo positivo sia più del 90%.

Altri studi hanno fornito una validazione esterna degli algoritmi, ma hanno dimostrato che la presenza delle tipiche caratteristiche di ipervascolarizzazione arteriosa e washout venoso, è così altamente specifica che è necessario un singolo studio se queste caratteristiche sono presenti.¹⁰⁸ La sensibilità dell'utilizzo di due tecniche di imaging per la diagnosi è tra il 21% e il 37 % e la specificità del 100 %. Inoltre, due studi hanno ormai dimostrato che un imaging sequenziale può essere usato per diminuire la necessità di eseguire una biopsia.¹⁰⁸ Avvalersi di due studi sequenziali piuttosto che richiedere due studi che siano tipici, ha migliorato la sensibilità a circa 74-80%, ma la specificità è scesa al 89-97%. Tuttavia, se lesioni atipiche sono state sottoposte a biopsia, si giungeva comunque ad una specificità del 100%. Recenti studi hanno dimostrato così che il colangiocarcinoma intraepatico (ICC) non mostra washout nelle fasi venose ritardate alla risonanza magnetica, sottolineando ulteriormente la specificità di questo profilo nelle fasi iniziali.¹⁰⁹ Allo stesso tempo, sono stati descritti falsi positivi per HCC nell'utilizzo dell'ecografia con mezzo di contrasto in pazienti con biopsia che diagnosticava ICC¹¹⁰; pertanto se c'è qualche discrepanza tra le tecniche di imaging, e se si deve prendere in considerazione un trattamento, è bene eseguire una biopsia.

Anche se le raccomandazioni per le indagini di lesioni rilevate allo screening sono state sviluppate per essere utilizzate in pazienti cirrotici, si adattano ugualmente bene ai pazienti con epatite cronica B che non hanno completamente sviluppato la cirrosi. In entrambe le situazioni, la probabilità che l'epatocarcinoma sia presente è elevata. Per i noduli rilevati su fegato altrimenti normale, la probabilità di HCC è molto più bassa e le linee guida non

si applicano. Da quando la diagnosi radiologica è così importante, è essenziale che l'imaging sia effettuato correttamente. Esistono protocolli stabiliti per la diagnosi di HCC che variano in funzione del tipo di apparecchiatura utilizzata, che definiscono la quantità di contrasto da somministrare, il metodo di gestione del contrasto, la tempistica dell'acquisizione delle immagini dopo la somministrazione del mezzo di contrasto.

Va sottolineato che gli algoritmi non sono infallibili. Ci possono essere dei falsi negativi; le lesioni dovrebbero essere rilevate all'imaging nel follow-up, prima che raggiungano una dimensione tale che la probabilità di guarigione si riduce notevolmente. Molto è stato fatto sulla valutazione dell'HCC ipovascolare. Questa è una lesione che presenta un ridotto enhancement sia in fase arteriosa che venosa portale. Questo rappresenta un problema diagnostico solo per le piccole lesioni (<2 cm di diametro). Studi patologici di queste lesioni hanno dimostrato che la ragione di questa apparente ipovascolarizzazione è il doppio apporto di sangue.¹¹¹ Essi possono aver acquisito un certo apporto arterioso, ma non è completamente stabilito. Istologicamente, è presente un piccolo numero di arterie (nessun dotto biliare), e vi è ancora un apporto di sangue portale, sebbene ridotto. Con lo sviluppo neoplastico, l'apporto di sangue diventa sempre più arterializzato e la lesione acquisisce le caratteristiche tipiche dell'HCC. Poiché noduli displasici possono mostrare questo pattern istologico, è necessario effettuare una biopsia per distinguerli dall'HCC.

Purtroppo, anche con la biopsia, il segno distintivo che distingue un nodulo con displasia ad alto grado da un HCC, cioè l'invasione stromale, non può essere rilevato. Anche un HCC di dimensioni maggiori può essere ipovascolare, e nonostante la diagnosi si possa fare anche senza biopsia è necessario farla comunque. In aggiunta alle caratteristiche morfologiche per distinguere noduli displastici ad alto grado (HGDN) da HCC, ci sono diverse colorazioni istologiche che possono essere utili. I markers di HCC includono il glipicano 3,¹¹² la proteina shock termico (HSP-70) e la glutammina sintetasi. La colorazione dell'endotelio vascolare con CD 34 di solito è più positiva e fortemente positiva in HCC per le arterie più chiaramente identificate, considerando che, nel tessuto benigno solo l'epitelio sinusoidale si colora debolmente con questo anticorpo. La colorazione della citocheratina per l'epitelio biliare (CK 7 e CK 19) dovrebbe essere negativa, quindi una risposta positiva rende l'HCC meno probabile.¹¹³ Data la difficoltà di fare una diagnosi positiva di una biopsia che deriva da lesioni di piccole dimensioni, è bene utilizzare tutto il pannello delle colorazioni per distinguere l'HCC dagli HGDN.

Le attuali raccomandazioni per la diagnosi di HCC sono descritte nella figura 10. Per le lesioni inferiori ad 1 cm, le raccomandazioni rimangono invariate. Le lesioni <1 cm di

diametro agli ultrasuoni, soprattutto in un fegato cirrotico, hanno una bassa probabilità di essere HCC. La malignità è ancora meno probabile se non mostrano l'enhancement all'imaging dinamico.¹¹⁴ Anche se TC o RM evidenziano piccoli noduli con vascolarizzazione arteriosa, le aree vascolarizzate potrebbero non corrispondere a foci di HCC.¹⁰⁵ Tuttavia, la possibilità rimane alta che noduli epatici minuti rilevati con l'ecografia possano diventare maligni nel tempo.¹¹⁵ Quindi questi noduli hanno bisogno di essere seguiti al fine di rilevare la crescita suggestiva di trasformazione maligna. La mancanza di crescita per un periodo superiore a 1-2 anni suggerisce che la lesione non sia un HCC.

Non è necessaria alcuna indagine approfondita, perché la maggior parte di essi saranno noduli cirrotici piuttosto che HCC. Tuttavia, è raccomandato un follow-up a intervalli di 3 mesi utilizzando la tecnica di imaging che per prima ha documentato la presenza dei noduli. Se sono stati rilevati allo screening ecografico, allora è consigliabile che il follow-up venga eseguito con l'ecografia. Per le lesioni superiori ad 1 cm di diametro, devono essere utilizzate sia la TC che la RM, che sono le tecniche più specifiche, l'ecografia con mezzo di contrasto è meno specifica. Se le caratteristiche delle lesioni sono tipiche dell'HCC su entrambe le metodiche, RM e TC, allora non è necessaria nessuna ulteriore indagine e la diagnosi di epatocarcinoma è confermata. Se invece le lesioni osservate non assumono il tipico pattern vascolare (e non è indicativo di emangioma) è bene eseguire un secondo studio con un'altra metodica (TC o RM). A questo punto se il pattern diventa tipico allora il sospetto diagnostico è confermato. In alternativa, un quadro ancora atipico potrebbe suggerire la necessità di una caratterizzazione istologica.

Bisogna inoltre sottolineare che la presenza di ipervascolarizzazione arteriosa da sola non è sufficiente, mentre la presenza di wash-out venoso è essenziale. Poiché le performance dello studio radiologico sono così importanti per la diagnosi non invasiva di HCC, si raccomanda la sua esecuzione in centri specializzati.

5.3 Diagnosi istologica della displasia e inizio dell'HCC

Una delle conseguenze dei programmi di sorveglianza è l'identificazione di "early" e "very early" HCC, nonché di noduli displastici. Minore è la lesione HCC, più difficile è distinguere la lesione maligna dai noduli benigni, sia radiologicamente che istologicamente. Recentemente, è stata fatta una distinzione tra l'"early" e il "very early" HCC¹¹⁶ o l'HCC "progressed".¹¹⁷ L'HCC precoce, come definito dai patologi giapponesi, è generalmente ipovascolare, ed ha margini mal definiti.¹⁰² Quindi, ha un contorno un po'

vago agli ultrasuoni e può essere ipovascolare alla TC. Istologicamente, ci sono poche arterie spaiate, ma le cellule mostrano diversi gradi di displasia.¹¹⁸ Ci può essere un'invasione dello spazio portale da parte degli epatociti, ma l'invasione vascolare è assente. Queste lesioni sono state definite "very early" HCC dal Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC).¹¹⁹ La patologia di queste lesioni è stata definita in campioni resecati e, quindi, la loro storia naturale non è nota. Tuttavia, è stata osservata la presenza di piccoli foci di HCC tipico all'interno di essi, suggerendo che siano dei precursori di lesioni HCC tipiche; come si sviluppano queste lesioni di HCC tipico non è noto. Gli "small" o "progressed" HCC hanno invece margini ben definiti agli ultrasuoni, e mostrano le tipiche caratteristiche dell'HCC ben differenziato alla TC e alla biopsia.¹¹⁷ Nonostante le loro piccole dimensioni spesso le lesioni presentano invasione microvascolare,¹¹⁸ la quale suggerisce una prognosi, dopo il trattamento, meno ottimale rispetto a quella dell'"early" HCC dove l'invasione vascolare è rara. Tuttavia, questo non è stato dimostrato in studi clinici. La classificazione e la descrizione dei noduli displasici e l'inizio dell'HCC sono state recentemente riviste per omogeneizzare gli approcci dei patologi occidentali e di quelli giapponesi.¹¹⁷ E' importante riconoscere piuttosto, che pur essendo i singoli stati discreti, c'è un continuum tra gli HGDN e l'HCC (Fig. 12). Questo complica la valutazione delle biopsie di piccoli noduli.

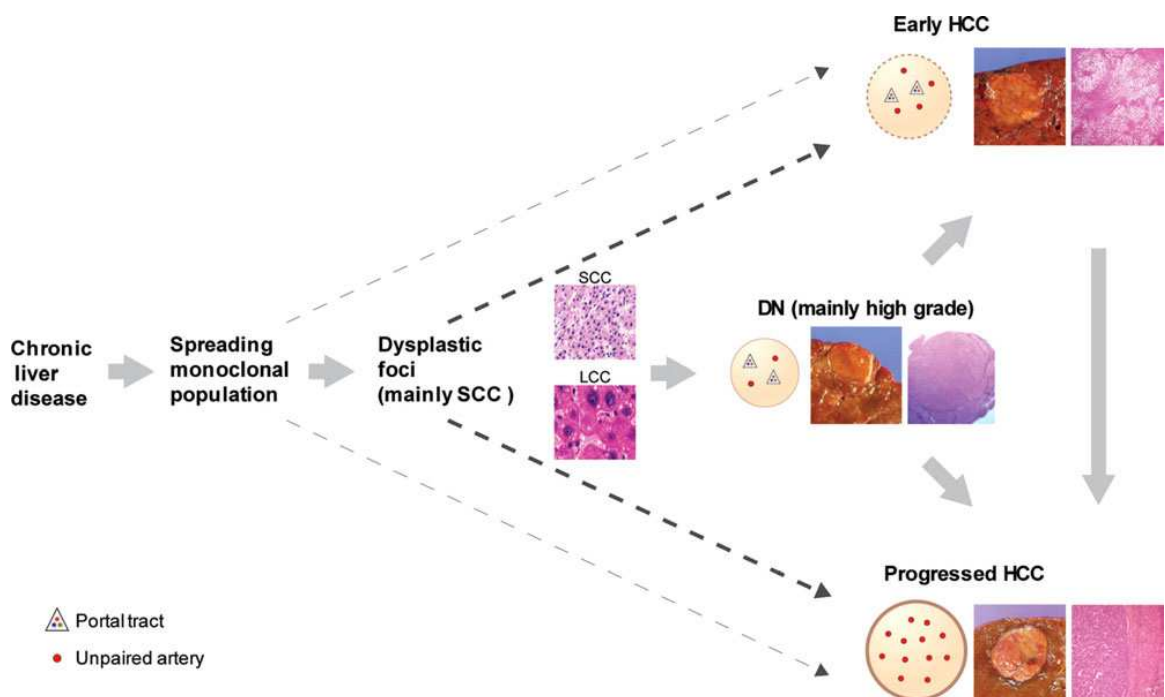


Figura 12. Rappresentazione schematica dei concetti attualmente accettati di progressione delle popolazioni clonali nella malattia epatica cronica a DNS, early HCC e HCC progredito.

I pazienti con noduli epatici che hanno un pattern vascolare aspecifico e una biopsia negativa dovrebbero continuare a sottoporsi a un follow-up maggiore. A questo punto non vi sono dati che definiscono un follow-up migliore, ma ripetere una biopsia o fare un follow-up con TC/RM dovrebbe essere considerato per rilevare l'ulteriore crescita dei noduli. Stanno emergendo dati che indicano che più piccola è la lesione, meno probabilità c'è che ci possa essere un'invasione vascolare microscopica.¹⁰² Inoltre, le lesioni più piccole hanno maggiore probabilità di essere associate ad un trattamento che potrebbe essere curativo.¹¹⁶ Infine l'analisi dei risultati, pertanto, conferma idealmente, che per ottenere il miglior risultato in termini di outcome, la lesione al momento della diagnosi dovrebbe essere più piccola di 2 cm.¹²⁰ Quindi è importante fare diagnosi di HCC più precocemente possibile ed evitare di effettuare un trattamento invasivo in lesioni che non hanno alcun potenziale maligno e che possono regredire silenziosamente. Questa però è una sottile distinzione che non è sempre possibile fare.

Complicanze correlate alla biopsia epatica sono il rischio di sanguinamento e l'inseminamento neoplastico con l'ago utilizzato. Nella maggior parte degli studi si è fatta una valutazione dell'inseminamento lungo il percorso dell'ago senza specificare la dimensione della lesione alla biopsia.¹²¹ Sebbene il tasso di inseminamento dell'ago dopo una biopsia di lesioni <2 cm, non è stata accuratamente misurata, è probabilmente raro.¹²¹

Per cui noduli trovati durante la sorveglianza ecografia che presentano dimensioni < 1cm devono essere seguiti con ultrasuoni ad intervalli di 3-6 mesi. Se non c'è stata alcuna crescita in un periodo fino a 2 anni, si può tornare alla sorveglianza di routine.

Noduli più grandi di 1 cm trovati agli ultrasuoni nella proiezione di un fegato cirrotico dovrebbero essere indagati la TC o la RM con mezzo di contrasto nelle 4 fasi. Se il pattern vascolare è tipico, la lesione deve essere trattata come un HCC.

Se i risultati non sono caratteristici o il profilo vascolare non è tipico, deve essere eseguita un'altra tecnica di imaging o la biopsia della lesione.

Le biopsie di lesioni di piccole dimensioni dovrebbero essere valutate da patologi esperti mediante le varie colorazioni dei markers attualmente disponibili tra cui: CD34, CK7, glipicano 3, HSP-70 e glutammina sintetasi, per migliorare l'accuratezza diagnostica.

5.4 Istologia

Paradossalmente, con l'aumento del riconoscimento del carcinoma epatocellulare, la biopsia epatica viene utilizzata sempre meno frequentemente per la diagnosi a meno che non si riscontrino delle lesioni "atipiche" all'imaging.^{100, 122}

Macroscopicamente, infatti, il tumore può assumere l'aspetto di una massa unifocale (generalmente di grosse dimensioni), di noduli multifocali di dimensioni variabili ampiamente distribuiti, o di un cancro diffusamente infiltrante, che invade largamente fino ad interessare a volte l'intero organo. Tutti e tre i quadri possono portare all'epatomegalia, in particolare quello unifocale e quello multinodulare. Il tumore diffusamente infiltrante può invece sfumare impercettibilmente in un contesto cirrotico.

Gli HCC sono di solito più “chiari” del fegato circostante e talvolta assumono un colore verde se composti da epatociti ben differenziati in grado di secernere bile. Il carcinoma epatocellulare (HCC), ossia un tumore maligno derivante dagli epatociti, può presentare una o tutte le caratteristiche citologiche e/o architettiche di differenziazione epatocellulare, insieme a quelle di malignità. L'identificazione della bile e/o canalicoli intercellulari sono diagnostici dell'origine cellulare del tumore.

L'HCC varia da lesioni ben differenziate a lesioni anaplastiche altamente indifferenziate. Nei tumori moderatamente o ben differenziati le cellule riconoscibili come di origine epatocitaria sono disposte sia secondo un pattern trabecolare, che riassume l'architettura delle filiere epatocellulari, sia in pattern acinari o pseudoghiandolari. Nelle forme scarsamente differenziate, le cellule tumorali possono assumere aspetti pleiomorfi con numerose cellule giganti anaplastiche, diventare cellule piccole completamente indifferenziate o addirittura assomigliare al sarcoma fusocellulare.

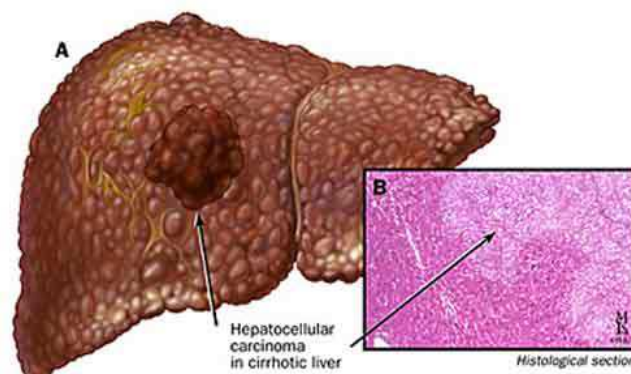


Figura 13. A. Rappresentazione di un fegato cirrotico nodulare in cui si evidenzia una lesione neoplastica. B. Evidenza istologica della cirrosi e dell'epatocarcinoma.

Una variante distintiva dell'HCC è il carcinoma fibrolamellare, descritto per la prima volta nel 1956. Questa variante rappresenta il 5% degli HCC e compare nei giovani adulti, 20-40 anni di età, con la medesima frequenza nei due sessi. Poiché i pazienti in genere non presentano epatopatie croniche sottostanti, e di conseguenza non sono cirrotici, la prognosi è migliore rispetto a quella che si ha nei casi di HCC tipico.¹²³ L'eziologia del carcinoma fibrolamellare è sconosciuta. Si presenta in genere come un tumore isolato, grande, duro, “scirroso” con bande fibrose che lo attraversano. All'esame microscopico è composto da grandi cellule poligonali ben differenziate che si dispongono in nidi o cordoni separati da fasci densi e paralleli di collagene fibrillare. Le cellule tumorali hanno citoplasma abbondante, eosinofilo, e nucleoli prominenti.

Sottotipi comunemente accettati oltre al fibrolamellare HCC (FLC), sono lo “scirrhous HCC”, l'HCC sarcomatoide, e il cosiddetto HCC infiammatorio o il carcinoma linfopiteliale-like (LEL). La componente scirrosa può essere sotto capsulare e in genere è associata a ipercalcemia.

Una caratteristica del cosiddetto HCC avanzato è la presenza di arterie spaiate all'interno del nodulo tumorale. L'invasione intravascolare o intraduttale tumorale e stromale è rara ma indicativa di malignità. L'invasione stromale è meglio riconosciuta in grandi sezioni di tessuto di HCC incapsulato in un contesto di cirrosi; la cheratina 7¹¹³ e la cheratina 19¹²⁴ mostrano la perdita progressiva della reazione perinodulare dei dotti, dai noduli cirrotici a quelli displasici, ai noduli di HCC. In alcuni casi, l'apparente superamento degli spazi portal residui può essere apprezzato nell'invasione stromale di HCC.

Dal punto di vista citologico gli epatociti maligni manifestano quasi tutti gli aspetti degli epatociti benigni; l'eccezione è l'accumulo di granuli di ferro. Il citoplasma può essere profondamente eosinofilo, basofilo, o chiaro. Aggregati citoplasmatici possono includere la steatosi, il fibrinogeno (i cosiddetti corpi pallidi), glicogeno (Cellule chiare) o inclusioni di glicoproteina (Acido periodico reattivo di Shiff con diastasi-positiva) e corpi di Mallory-Denk; inclusioni nucleari includono glicogeno o grandi nucleoli. I contorni nucleari sono spesso irregolari, e il rapporto nucleo/citoplasma è aumentato. Inoltre possono essere presenti in HCC anche cellule giganti multinucleate.

La difficoltà maggiore per i patologi è distinguere noduli displastici (DN) di alto grado dall'HCC in fegati cirrotici,^{125, 126} e nei fegati non cirrotici, dagli adenomi epatocellulari.¹²⁷ Proposte per il primo tipo sono state fatte, compresa un'analisi dettagliata delle varie caratteristiche istologiche di routine quali lo spessore delle filiere, l'invasione vascolare e capsulare e le caratteristiche nucleari,¹²⁸ o l'utilizzo di immunomarkers come la proteina

shock termico 70 (HSP70), la glutammina sintetasi (GS), e il glypican-3 (GPC-3) in varie combinazioni. Un gruppo ha suggerito l'uso di annessina-2.¹²⁹ *Di Tommaso et al.*¹³⁰ hanno dimostrato che in tutti i DNS nel fegato cirrotico studiato, non è mai stata riscontrata la positività per tutti e tre i markers (HSP70, GS, e GPC-3), ma la combinazione ha identificato correttamente il 43,7% degli HCC; il 72,7% dei DN sono risultati negativi per tutti e tre i marcatori. Sono stati pubblicati anche i valori di due o tre marcatori positivi nelle biopsie epatiche.¹³¹ L'Annessina 2 era più utile nel pattern sinusoidale diffuso (82% dei carcinomi epatocellulari rispetto allo 0 dei DN) rispetto all'epatocellulare o al pattern sinusoidale zonale.¹²⁹

Tutti i tipi di epatocarcinoma hanno una forte propensione ad invadere le strutture vascolari, da cui conseguono estese metastasi intraepatiche; talvolta lunghe masse neoplastiche, simili a serpenti, invadono le vene portali (con occlusione della circolazione portale) o la vena cava inferiore e possono estendersi, in casi particolarmente gravi e fortunatamente rarissimi, anche alle cavità destre del cuore. L'HCC diffonde ampiamente all'interno del fegato per contiguità e con lo sviluppo di noduli satelliti, che, con metodi di biologia molecolare, risultano derivati dal tumore principale. Le metastasi extraepatiche originano principalmente per invasione vascolare, in particolare attraverso il sistema delle vene epatiche; tuttavia nelle fasi avanzate della malattia sono frequenti anche metastasi ematogene. Le metastasi ai linfonodi peri-ilari, peripancreatici e para-aortici sopra e sottodiaframmatici si osservano in meno della metà degli HCC che diffondono in sede extraepatica. Se un HCC con invasione venosa viene identificato durante un espanto nel corso di un trapianto di fegato, la recidiva del tumore nel fegato trapiantato è frequente.

5.5 Inquadramento diagnostico del paziente con epatopatia cronica e riscontro di lesione focale epatica (sospetto HCC)

Obiettivo	Indagini
Caratterizzazione e stadiazione della lesione focale epatica:	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Ecografia Addome Superiore + eventuale studio contrastografico</u>: mirata sia alla caratterizzazione diagnostica, sia alla valutazione della eleggibilità ai trattamenti percutanei (Alcolizzazione, Termoablazione con RF) • <u>TC Addome Superiore</u> o <u>RMN Addome Superiore</u>: ulteriore caratterizzazione e stadiazione della malattia nodulare (eventualmente da concordare con il Collega Radiologo) • <u>Biomateriali</u>: AFP, Ca 19-9. • <u>Agobiopsia ecoguidata</u> (nei limitati casi in cui il comportamento radiologico non è tipico per HCC e/o nel sospetto di lesione focale di altra natura)
Caratterizzazione dell'epatopatia cronica: <ul style="list-style-type: none"> ○ definizione eziologica ○ stadiazione 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Indagini biomateriali</u>: <ul style="list-style-type: none"> - Ricerche eziologiche (marcatori virologici HBV-HCV-HDV, metabolismo glicolipidico e marziale; Alfa1-antitripsina e Cupremia/ceruloplasmina per pazienti di età <50 anni; eventualmente marcatori di autoimmunità se clinicamente indicati) - Transaminasi, GGT, F.alcalina, Albumina, PT, bilirubina, PCHE, protidogramma - Emocromo • <u>Ecografia Addome Superiore</u> • <u>EGDscopia</u> (se evidenza ECO/TC/RMN di ipertensione portale)
Ulteriori indagini preliminari ad operatività diagnostica e interventistica	<ul style="list-style-type: none"> • Gruppo sanguigno • Creatinina, n. Dibucaina, PTT, Fibrinogeno • ECG + eventuale valutazione specialistica cardiologica ove necessario • RxTorace 2P

Allo scopo di ottimizzare il percorso diagnostico per l'HCC, le indagini diagnostiche biomateriali e strumentali (ECO-TC) mirate alla caratterizzazione della lesione focale epatica vengono compattate nell'ambito di un unico pacchetto diagnostico.

5.6 Stadiazione

La prognosi dei tumori solidi è generalmente correlata allo stadio del tumore al momento della presentazione, e quindi lo stadio del tumore guida le decisioni terapeutiche. Tuttavia, nei pazienti con carcinoma epatocellulare la predizione di prognosi è più complessa, in quanto questa è influenzata anche dalla funzione del fegato sottostante. Nel soggetto con epatocarcinoma e cirrosi la sopravvivenza spontanea e quella dopo trattamento, sono condizionate non solo dalle caratteristiche della neoplasia (biologia del tumore, estensione,

interessamento vascolare, presenza di metastasi), ma anche da quelle della cirrosi: eziologia, persistenza di attività di malattia, entità della riserva funzionale residua, entità dell'ipertensione portale. Pertanto nell'impostazione delle scelte terapeutiche, e conseguentemente dell'iter diagnostico propedeutico, occorre tener presente tutti i fattori prognostici. Non vi è consenso in tutto il mondo per l'uso di un determinato sistema di stadiazione, e quindi quale sia il sistema da preferire rimane controverso. Qualsiasi sistema di stadiazione dovrebbe classificare i pazienti in sottogruppi con risultati significativamente differenti, e allo stesso tempo dovrebbe aiutare a definire la terapia. Storicamente, l'HCC è stato classificato dal TNM¹³² o dall'Okuda staging systems.¹³³ Il sistema TNM è stato modificato ripetutamente, e continua a non avere una accuratezza prognostica sufficiente. Inoltre, il suo uso è limitato perché si basa su un quadro patologico e la funzionalità epatica non è considerata. Uno studio multicentrico internazionale ha sviluppato un punteggio in base alla valutazione dello stato del fegato (cirrosi vs senza cirrosi) insieme alla stadiazione del tumore, secondo la classificazione TNM,¹³⁴ ma la sua validità è stata solo valutata in pazienti sottoposti a resezione.

Classificazione TNM		
Tumore primitivo (T)	Interessamento linfonodale (N)	Metastasi a distanza (M)
TX: tumore primitivo non definibile	NX: linfonodi regionali non valutabili	MX: metastasi a distanza non accertabili
T0: tumore primitivo non evidenziabile	N0: linfonodi regionali liberi da metastasi	M0: metastasi a distanza assenti
T1: tumore unico senza invasione vascolare	N1: metastasi nei linfonodi regionali	M1: metastasi a distanza presenti
T2: tumore unico con invasione vascolare o tumori multipli con diametro = 5 cm		
T3: tumori multipli con diametro >5 cm o tumore con interessamento di un ramo principale della vena porta o delle vene epatiche		
T4: tumore unico o tumori multipli che invadono organi adiacenti oltre che la cistifellea		

stadio	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIA	T3	N0	M0
IIIB	T4	N0	M0
IIIC	ogni T	N1	M0
IV	ogni T	ogni N	M1

Il primo sistema di classificazione prognostica che teneva conto dello stadio della neoplasia che di quello della cirrosi è stato proposto da *Okuda et al.*¹³³ nel 1985: esso include 3 variabili che valutano la funzione epatica (ascite, albumina, bilirubina) e una classificazione grossolana dell'estensione del tumore (maggiore o minore del 50% del volume epatico). Sono definiti tre stadi che identificano 3 differenti livelli di prognosi della malattia. Esso permette l'identificazione del tumore allo stadio terminale, ma è in grado di stratificare adeguatamente i pazienti con malattia iniziale o intermedia. Questa classificazione ha il limite di essere stata disegnata con un approccio retrospettivo, su pazienti con malattia avanzata al momento della diagnosi, situazione che oggi si presenta solo nel 50% dei casi. In questo sistema, importanti parametri prognostici come l'uni o la multifocalità, l'invasione vascolare e la presenza di localizzazioni extraepatiche, non sono inclusi.

PUNTEGGIO DI OKUDA		
Estensione del Tumore	< 50%	-
	> 50%	+
Albumina	< 3 g/dl	+
	> 3 g/dl	-
Bilirubina	> 3 mg/dl	+
	< 3 mg/dl	-
Ascite	SI	+
	NO	-

OKUDA 1	TUTTI -
OKUDA 2	1 o 2 +
OKUDA 3	3 o 4 +

Diversi sistemi di punteggio sono stati sviluppati negli ultimi anni, per tentare di stratificare i pazienti in base alla prevista sopravvivenza. Schemi sono stati proposti a Barcellona, in Francia, in Italia,¹³⁵ in Austria,¹³⁶ Cina¹³⁷ e Giappone.¹³⁸ Questi sistemi sono in grado di suddividere i pazienti in strati con prognosi differenti, ma sono per lo più utili nell'identificare i pazienti in fase terminale con una prognosi sfavorevole. Inoltre questi sistemi presentano una buona capacità discriminante nelle casistiche sulle quali sono stati prodotti, ma spesso mancano di validazione su casistiche esterne oppure non confermano la stessa capacità predittiva al di fuori della coorte di partenza. La mancanza di riproducibilità probabilmente indica la presenza di eterogeneità tra i diversi gruppi di pazienti e questo rende meno facile la messa a punto di un sistema di stadiazione universale.

La stadiazione CLIP (*Cancer of the Liver Italian Program*)¹³⁵ è stata disegnata da un gruppo italiano, utilizzando un data base di 435 pazienti, con l'intento di superare i limiti delle classificazioni TNM e Okuda. Infatti, il CLIP include la funzione epatica secondo la classificazione di Child-Pugh¹³⁹, la morfologia macroscopica del tumore (uninodulare, multinodulare, massivo), e la sua estensione nel fegato, la presenza di elevati valori di AFP (≥ 400 ng/ml) e la presenza di trombosi portale neoplastica.

CLASSIFICAZIONE DI CHILD PUGH			
Parametri	Punti assegnati		
	1	2	3
Ascite	Assente	lieve	moderata
Bilirubina, mg/dL	≤ 2	2-3	>3
Albumina, g/dL	>3.5	2.8-3.5	<2.8
PT secondi (INR)	1-4 (<1.7)	4-6 (1.7-2.3)	>6 (>2.3)
Encefalopatia	Assente	Grado 1-2	Grado 3-4

Classe	Punteggio
A	5-6
B	7-9
C	10-15

La combinazione delle diverse variabili del CLIP segrega i pazienti in 6 categorie (con punteggio da 0 a 6). Il CLIP è stato validato prospetticamente¹⁴⁰. Rispetto alla classificazione di Okuda, il CLIP ha dimostrato maggiore accuratezza prognostica e maggiore capacità di discriminare gruppi omogenei.

CLIP			
Variabili	Punteggio		
	0	1	2
Child-Pugh	A	B	C
Morfologia del tumore	Uninodulare ed estensione $\leq 50\%$	Multinodulare ed estensione $\leq 50\%$	Massivo o estensione $>50\%$
AFP (ng/ml)	<400	≥ 400	
Trombosi portale	No	Si	

Recentemente, *Marrero et al.*¹⁴¹ e *Grieco et al.*¹⁴² hanno confrontato tutti i sistemi disponibili e validato il sistema BCLC nei pazienti statunitensi e italiani, rispettivamente. Il sistema di stadiazione del Barcellona Clinic Liver Cancer (BCLC)^{143, 144} è stato originariamente proposto nel 1999 e sviluppato sulla base della combinazione di dati

provenienti da diversi studi indipendenti, che rappresentano diversi stadi della malattia e/o modalità di trattamento, e revisionato nel 2003¹⁴². Questo sistema di stadiazione consente la stratificazione dei pazienti in 5 gruppi sulla base del performance status (secondo i criteri proposti dall'Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG), della classe funzionale di Child-Pugh e delle caratteristiche della neoplasia. L'elemento fondamentale e innovativo di questo sistema è rappresentato dalla valutazione consensuale di variabili dipendenti dalla neoplasia e di quelle dipendenti dalla patologia di base (la cirrosi epatica), con riferimento a dati laboratoristici, clinici e soggettivi del paziente. Il sistema non si limita alla sola predizione della sopravvivenza del paziente e/o alla definizione della prognosi ma consente di identificare una strategia terapeutica adeguata a ciascun paziente.

Performance Status	
PS 0	piena attività, in grado di praticare l'abituale attività senza alcuna restrizione
PS 1	lieve limitazione delle attività pesanti, in grado di eseguire le faccende domestiche o il lavoro d'ufficio
PS 2	in grado di attendere alla cura personale, incapace di attività lavorative per più del 50 % del tempo
PS 3	capace della sola cura personale, costretto a letto o in poltrona per più del 50 % della giornata
PS 4	completamente non autosufficiente, costretto a letto o in poltrona

L'elemento di maggiore innovazione del sistema BLCL è la possibilità di unire la valutazione prognostica e l'indicazione terapeutica. Inoltre, diversamente dagli altri sistemi di classificazione, i pazienti non vengono stratificati sulla base di un punteggio totale risultante dalla somma di ciascuna variabile. Questa classificazione è stata convalidata e approvata da AASLD e EASL.

Sulla base della BCLC vengono distinti quattro stadi:

- Very early stage (0): include pazienti con neoplasia singola di diametro inferiore ai 2 cm (carcinoma in situ), con funzione epatica conservata (classe Child-Pugh A) e senza segni e sintomi correlati alla neoplasia. In genere si tratta di piccole lesioni neoplastiche ben differenziate, con dotti biliari e rami portalì, prive di invasione delle strutture contigue.
- Early stage (A): include pazienti con HCC singolo o con un numero di noduli ≤ 3 , ciascuno di diametro ≤ 3 cm, con funzione epatica conservata (classe Child-Pugh A e B).

- Intermediate stage (B): include pazienti con neoplasia multinodulare (> 3 noduli di diametro > 3 cm), senza evidenza di invasione vascolare né di localizzazione extraepatica, in buon compenso funzionale (Child-Pugh A e B).
- Advanced stage (C): include pazienti che manifestano sintomi correlati alla neoplasia (Performance Status 1-2), con invasione vascolare e/o localizzazioni extraepatiche.
- Terminal stage (D): include pazienti in stadio terminale, con funzione epatica compromessa (classe Child-Pugh C) e severa disabilità correlata alla patologia neoplastica (Performance Status > 2).

I diversi stadi identificano anche i pazienti con HCC precoce che possono trarre beneficio da terapie curative, i pazienti con stadio di malattia intermedio o avanzato che possono beneficiare di cure palliative, e infine i pazienti in stadio terminale per i quali non sussiste indicazione a trattamenti antineoplastici.

BCLC Stage		Tumor	Liver Function Status	Performance Status
Stage A (Early HCC)	0	Single <2cm	No PH and normal bilirubin	PS 0
	A1	Single	No PH and normal bilirubin	PS 0
	A2	Single	PH and normal bilirubin	PS 0
	A3	Single	PH and abnormal bilirubin	PS 0
	A4	<=3 Tumors <3 cm	Child-Pugh A-B	PS 0
Stage B (Intermediate HCC)		Large, multinodular	Child-Pugh A-B	PS 0
Stage C (Advanced HCC)		Vascular invasion or extrahepatic spread	Child-Pugh A-B	PS 1-2
Stage D (End-stage HCC)		any	Child-Pugh C	PS 3-4

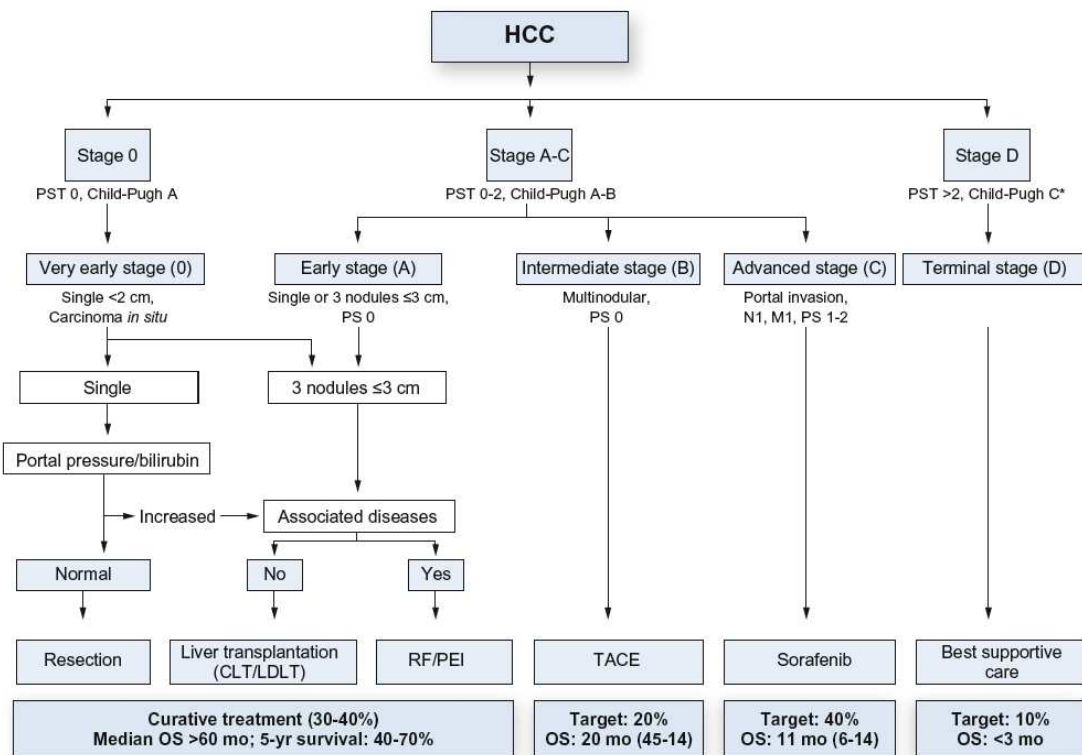


Figura 14. Algoritmo Prognostico-terapeutico secondo BCLC aggiornato al 2011¹⁴⁵

La malattia in stadio precoce include pazienti con funzionalità epatica conservata (Child-Pugh A e B) con HCC solitario <5 cm o fino a 3 noduli < 3 cm di grandezza, (caratteristiche del tumore che corrispondono ai cosiddetti “criteri di Milano”, identificati da *Mazzaferro et al.*)¹⁴⁶ come condizione a minor rischio di recidiva neoplastica dopo trapianto di fegato per HCC. Questi pazienti possono essere trattati efficacemente con la resezione, il trapianto fegato o l'ablazione percutanea con una sopravvivenza a 5 anni che va dal 50% al 75%. Il miglior successo è ottenuto nei pazienti con “very early HCC”, in quanto la più frequente assenza di invasione microvascolare e di diffusione locale garantisce la più alta probabilità di guarigione. Lo stadio intermedio è composto da pazienti Child-Pugh A e B con HCC di grandi dimensioni/multifocale che non hanno sintomi connessi con il tumore e non hanno invasione macrovascolare o diffusione extraepatica. La loro sopravvivenza a 3 anni senza terapia può raggiungere il 50%. Questi sono i candidati ottimali per la chemio-embolizzazione transarteriosa. I pazienti che si presentano con i sintomi e/o con invasione vascolare o diffusione extraepatica, si trovano già in fase avanzata. Essi hanno una minore aspettativa di vita (50% di sopravvivenza a 1 anno) e sono candidati ad entrare in studi terapeutici con nuovi farmaci. Infine, i pazienti con progressione del tumore che porta a grave deterioramento della loro capacità fisica [WHO performance status > 2] (tabella 3)¹⁴⁷ e/o hanno una grave compromissione della

funzionalità epatica (Child-Pugh C), sono considerati in stadio terminale. La loro sopravvivenza media è inferiore a 3 mesi.

Lo score proposto da *Chevret et al.* nel 1999, fornisce una semplice classificazione per la valutazione della sopravvivenza in pazienti affetti da HCC. Utilizzando un data base di 761 pazienti, l'analisi multivariata identificava 5 variabili correlate alla prognosi. Lo score classifica i pazienti in 3 gruppi con decrescente tasso di sopravvivenza ad un anno.

Il CUPI (*Chinese University Prognostic Index*)¹³⁷ è un indice prognostico elaborato su una coorte di 926 pazienti cinesi, che combina TNM, parametri clinici e bioumorali. Il CUPI si è dimostrato superiore alla stadiazione di Okuda, TNM e CLIP nel predire la sopravvivenza, ma non è stato confermato in pazienti occidentali.

CUPI	
Parametri	Punteggio
I e II	- 3
IIIa e IIIb	- 1
IVa e IVb	0
Paziente asintomatico	- 4
Ascite	3
Alfa-fetoproteina = 500 ng/ml	2
Bilirubina totale (μmol/l)	
<34	0
34-51	3
≥52	4
Fosfatasi alcalina = 200 unità/l	3

Rischio	Punteggio
Basso	≤ 1
Medio	2-7
Alto	≥ 8

Un ulteriore scoring system multidimensionale di recente pubblicazione è il JIS (*Japanese Integrated Staging*)¹⁴⁸. Questo score prognostico, che si basa su una combinazione tra una versione giapponese del TNM e le caratteristiche della cirrosi secondo Child Pugh, è stato validato su di una coorte di oltre 4.000 pazienti giapponesi affetti da HCC.¹⁴⁹ In tale studio il JIS è risultato più efficace del CLIP. Il disegno dello score tuttavia sembra adattarsi più alla stratificazione prognostica di pazienti a destino terapeutico non chirurgico, visto il valore differenziativo attribuito alle dimensioni del nodulo con cut-off a 2 cm, come rimarcato in una recente review di *Wildi*.¹⁵⁰

L'orientamento della comunità degli epatologi è di utilizzare sistemi di stadiazione diversificati in relazione alla prognosi, trattamento e stadio della malattia.¹⁵¹ La sorveglianza ecografica e l'attuale approccio terapeutico hanno notevolmente migliorato la prognosi dei pazienti con epatocarcinoma.¹⁵² Allo stato attuale, lo score CLIP è l'unica classificazione validata in maniera prospettica in differenti pazienti ed aree geografiche. La sua capacità prognostica e discriminante sembra superiore ad altre classificazioni. Essendo, però, limitata dalla bassa sensibilità per tumori piccoli, non è accurata per guidare la scelta del trattamento.

La stadiazione BCLC, validata prospetticamente in USA e Italia, facilita la categorizzazione dei pazienti in relazione al trattamento ed in particolare è dotata di buona sensibilità nell'identificare pazienti candidati alle terapie curative.

L'obiettivo di una stadiazione universalmente accettata è molto ambizioso e potenzialmente utile per migliorare l'accuratezza della prognosi nel singolo paziente, favorire la selezione dei pazienti alle diverse terapie ed infine per identificare gruppi omogenei di pazienti per confrontare l'efficacia terapeutica.

Studi in corso di genomica e di proteomica caratterizzeranno l'HCC più accuratamente, in modo tale che in futuro i pazienti con HCC possano essere classificati e trattati anche in base al loro profilo molecolare e non solo secondo la valutazione approssimativa del peso del tumore e delle misure convenzionali della funzione epatica.

6. Terapia del carcinoma epatocellulare

In passato la diagnosi di HCC è stata spesso fatta quando la malattia era avanzata, quando i pazienti erano sintomatici e presentavano un grado variabile di disfunzione epatica. In questa fase tardiva praticamente nessun trattamento ha avuto alcuna possibilità di essere efficace o di migliorare significativamente la sopravvivenza. Inoltre, la morbidità associata alla terapia (che era solitamente limitata alla resezione chirurgica o alla chemioterapia sistemica) era inaccettabile.

Oggi si arriva alla diagnosi in uno stadio precoce della neoplasia, più frequentemente la funzionalità epatica è conservata e non ci sono sintomi correlati alla neoplasia. Sono inoltre disponibili diverse opzioni di trattamento che possono avere un impatto positivo sulla sopravvivenza.¹⁵³ Tuttavia, per ottenere i migliori risultati si richiede una attenta selezione dei candidati per ogni opzione di trattamento e l'applicazione di questi trattamenti da parte di operatori esperti. Data la complessità della malattia e le diverse tipologie di trattamento disponibili, i pazienti con diagnosi di HCC dovrebbero essere

indirizzati a gruppi multidisciplinari che coinvolgono epatologi, patologi, radiologi, chirurghi e oncologi.

È importante notare che il livello di evidenza per la maggior parte delle opzioni terapeutiche è limitato a studi di coorte con pochi RCT, molti dei quali sono limitati al trattamento della malattia avanzata.¹⁵⁴ Non ci sono studi che confrontano i trattamenti considerati curativi per la malattia in stadio precoce (resezione chirurgica, il trapianto, l'ablazione percutanea) né vi sono studi di confronto tra questi metodi e l'assenza di trattamento. Quindi, la strategia di cura deve tener conto delle evidenze scientifiche disponibili, oltre che della disponibilità di risorse. Ciò è particolarmente rilevante quando si considera il trapianto di fegato, che è consolidato negli Stati Uniti e in Europa, ma che in alcune aree del mondo non è disponibile o ha un'applicabilità molto limitata. Per i pazienti con HCC solitario di diametro inferiore a 5 cm insorto su una cirrosi scompensata e nei pazienti con malattia multifocale precoce (fino a 3 lesioni di dimensioni inferiori a 3 cm) l'opzione migliore è il trapianto di fegato, ma per i pazienti con tumori solitari a cirrosi ben compensata la strategia ottimale di trattamento è ancora in discussione.¹⁵⁵

È diventato comune, per valutare i risultati, l'uso del tasso di sopravvivenza libera da malattia (disease free survival, DFS). Tuttavia, sebbene questo parametro sia clinicamente informativo, può essere fuorviante, perché si tratta di un indice composito della registrazione di due eventi: la morte e la recidiva di tumore. Questo è particolarmente rilevante nei pazienti con HCC che presentano una cirrosi sottostante e quindi sono a rischio di morte legato alla cirrosi stessa o alla progressione del tumore.

Di conseguenza, i risultati diversi in termini di DFS possono essere dovuti sia a differenze nel tasso di mortalità che del tasso di recidiva o di entrambi. Quindi, in teoria, anche se un trattamento può essere meno attivo contro il tumore rispetto ad un altro trattamento, e quindi portare a un più alto tasso di recidiva dopo il primo trattamento, la sopravvivenza globale potrebbe non differire o anche essere migliore. Tuttavia, dato il potenziale contributo della sottostante malattia epatica e l'effetto potenziale che l'epatotossicità correlata al trattamento potrebbe avere sul risultato, la scelta di questo tipo di trattamento è scoraggiato. Così, il parametro preferito per confronto primario tra differenti terapie dovrebbe essere la sopravvivenza. Queste osservazioni sono particolarmente importanti quando si parla di ciò che dovrebbe essere la prima opzione di trattamento in pazienti con cirrosi e con HCC precoce, la resezione chirurgica o il trapianto.

Analizzati i risultati che possono essere ottenuti con le diverse opzioni terapeutiche attualmente disponibili nella tradizionale pratica clinica, e individuati i criteri di selezione

che devono essere utilizzati, si valuta per ogni paziente l'opzione che fornisce la migliore sopravvivenza a lungo termine. Le terapie che sono note per offrire un alto tasso di risposte complete e, quindi potenzialmente curative, sono il trapianto, la resezione chirurgica, e l'ablazione percutanea.¹⁵³ Tra le terapie non curative le uniche che hanno dimostrato avere un impatto positivo sulla sopravvivenza sono la chemioembolizzazione transarteriosa e il sorafenib.¹⁵⁴ La radioembolizzazione (Transarterial Radio-Embolization, TARE) mostra una buona attività antitumorale,¹⁵⁶ ma non vi sono ancora studi prospettici che permettano di valutarne adeguatamente l'impatto sulla sopravvivenza. La chemioterapia sistemica con diversi agenti ha un'attività marginale con tossicità frequente, e non è associata con una migliore sopravvivenza. Infine, agenti come il Tamoxifene,¹⁵⁴ gli anti-androgeni,¹⁵⁷ o l'octreotide¹⁵⁸ sono risultati inefficaci.

6.1 Trapianto di fegato

Il primo quesito al quale bisogna rispondere nell'approccio terapeutico al paziente con epatocarcinoma associato a cirrosi è quello relativo alla sua elegibilità al trapianto di fegato. L'elegibilità al trapianto è condizionata dallo stadio della neoplasia, dall'età del paziente, dalla presenza di patologie concomitanti e dal quadro clinico complessivo. Quando questi criteri sono rispettati, la modalità con cui è stata effettuata la diagnosi può influenzare l'esito del trapianto: infatti, i soggetti in cui l'epatocarcinoma è stato evidenziato nel corso del monitoraggio periodico dell'epatopatia cronica, presenterebbero una prognosi più favorevole rispetto ai pazienti con diagnosi occasionale di neoplasia e cirrosi. I pazienti con HCC erano spesso parte delle esperienze iniziali con trapianto di fegato a causa della mancanza di un trattamento alternativo e di una scarsa aspettativa di vita. Ciò è stato necessario per stabilire la fattibilità dell'intervento. Allo stesso tempo, i primi risultati forniscono il razionale per l'applicazione di rigorosi criteri di selezione ai candidati che potrebbero trarre beneficio dal trapianto di fegato.¹⁵⁹ I pazienti con HCC che è stato rilevato solo in chirurgia (incidentale), perché la lesione era troppo piccola per essere rilevata da tecniche di imaging, hanno avuto un ottimo risultato che non differisce da quello di pazienti con malattia non-maligna. Questi tumori sono stati quelli che erano solitari e < 5 cm. In seguito l'esperienza di Francia, Italia, Spagna, e Germania ha mostrato che ottimi risultati potrebbero essere conseguiti nei pazienti con HCC singolo <5 cm o con fino a 3 noduli di dimensioni inferiori a 3 cm. Questi criteri sono conosciuti come i criteri di Milano, dopo lo studio di *Mazzaferro et al.*¹⁴⁶

La sopravvivenza a 5 anni dei pazienti in fase iniziale supera il 70%. Ciò ha confermato l'“early HCC” come una chiara indicazione per il trapianto di fegato nella pratica clinica convenzionale. La necessità di ottenere il beneficio ottimale dal numero limitato di organi che sono disponibili ha indotto il mantenimento di rigorosi criteri di selezione al fine di elencare solo i pazienti con HCC che hanno la più alta probabilità di sopravvivenza dopo trapianto. Tuttavia, questo significa che alcuni pazienti con HCC leggermente più avanzato in cui il trapianto offrirebbe un accettabile, ma non eccellente outcome, sono esclusi dalla procedura.^{160, 161} Questo ha recentemente alimentato un dibattito circa se e in che misura le indicazioni per il trapianto come terapia per il carcinoma epatocellulare possano essere ampliate.¹⁶² Ci sono dati molto limitati per supportare l'estensione dei criteri di selezione. Gli attuali criteri più restrittivi sono stati sviluppati quando le tecniche di imaging non erano così accurate come lo sono oggi e questo ha sempre significato un grado variabile di sottostadiazione, variando tra il 10% e il 15%.¹⁶³ Allo stesso tempo, nella maggior parte dei programmi il tempo di attesa per trapianto è abbastanza lungo che c'è una possibilità che l'HCC cresca oltre i criteri. Tuttavia, per i pazienti con malattia di là dei criteri standard per la lista, se la progressione della malattia non è stata ampia e non c'è invasione vascolare macroscopica o diffusione extraepatica, la sopravvivenza è paragonabile ai pazienti trapiantati per malattia entro i criteri standard. La maggior parte dei gruppi descrivono una sopravvivenza a 5 anni di circa il 50% nei pazienti trapiantati per criteri estesi^{160, 164} e questo è probabilmente la sopravvivenza più bassa accettabile.¹⁶⁵ Pertanto, è chiaro che vi è un certo margine di ampliamento dei criteri, ma attualmente non ci sono dati per definire i nuovi limiti. La maggior parte degli studi pubblicati che supportano l'espansione dei limiti si basano su un'analisi dei fegati espantati, informazioni che non sono disponibili prima di un intervento chirurgico.

Sono state proposte diverse strategie per consentire l'espansione di questi criteri, ma difetti metodologici hanno dimostrato che una solida valutazione dei criteri innovativi non può essere fatta. I primi a proporre criteri allargati furono Yao et al.,¹⁶⁰ dell'Università della California, San Francisco (UCSF). I criteri UCSF si basano anch'essi unicamente su parametri morfologici (lesione singola ≤ 6.5 cm, o al massimo 3 noduli con il maggiore ≤ 4.5 cm ed il diametro tumorale totale ≤ 8 cm, in assenza di metastasi e di invasione macrovascolare). Nel loro lavoro, Yao e coll. analizzarono retrospettivamente 70 pazienti sottoposti a trapianto di fegato per HCC in un periodo di 12 anni. I pazienti che rispettavano i nuovi criteri (60 pazienti, 86%) presentarono sopravvivenze globali ad 1 e 5 anni pari al 90% ed al 75,2%, rispettivamente, mentre i pazienti fuori dai criteri UCSF

mostrarono il 50% di sopravvivenza ad 1 anno. Tali risultati suggerirono come un modesto incremento dei criteri non determinasse un'importante decremento nelle sopravvivenze. Tuttavia, varie critiche vennero mosse a questo lavoro, prima delle quali fu quello di aver valutato lo staging tumorale in base ai dati anatomo-patologici e non a quelli radiologici. Infine, dati registrati hanno mostrato che ogni espansione è associata ad una riduzione della aspettativa di vita.^{166, 167} Quindi, la decisione critica non è che i criteri di della lista possono essere ampliati, ma come l'aspettativa di vita post-trapianto di tutta la coorte dei trapianti possa essere abbassata ed essere ancora accettabile, e l'effetto che l'espansione del pool di donatori può avere sulla mortalità per i pazienti non-HCC. Purtroppo sono questioni etiche che non sono ancora state risolte. Allo stesso tempo, criteri di imaging forti e validati per l'esclusione su minore progressione potenzialmente eccedente i Criteri di Milano, non sono stati definiti.

Il più potente predittore di recidiva in assenza di diffusione extraepatica è l'invasione vascolare macro o microscopica.¹⁶⁸ La probabilità di sviluppare questo evento va in parallelo alla dimensione del tumore e al numero di lesioni. Così ampliare i criteri di introduzione nella lista è una questione molto controversa, soprattutto se si considera la carenza di donatori. La differenziazione del tumore è stata proposta come predittore per l'invasione vascolare microscopica,¹⁶⁹ ma la sua valutazione richiederebbe una biopsia. Dal momento che i tumori di grandi dimensioni sono noti per essere eterogenei, l'accuratezza di questa strategia per la decisione clinica non è ottimale.

La mancanza di una sufficiente donazione di fegato è la principale limitazione per il trapianto di fegato. C'è sempre un periodo di attesa tra l'inserimento in lista e il trapianto. Questo varia tra i programmi, ma se sufficientemente lungo, il tumore può crescere e sviluppare le principali controindicazioni al trapianto (invasione vascolare, diffusione extraepatica). Il tasso di esclusione dalla lista di attesa può essere alto, come il 25%, se la lista d'attesa è più lunga di 12 mesi. Ovviamente, se i pazienti con tumori più avanzati sono inclusi, a causa di criteri di introduzione in lista espansi, il tasso di abbandono sarà più elevato e questo si tradurrà in peggiori caratteristiche di sopravvivenza su un'analisi up-to-treat. Studi di Barcellona e San Francisco hanno dimostrato che se il tasso di abbandono a causa della malattia avanzata è del 25% a 1 anno, questo si tradurrà in un tasso di sopravvivenza del 60% per il trapianto, sulla base di un intention-to-treat dei pazienti in lista piuttosto che quelli che realmente subisce il trapianto.¹⁷⁰ Inoltre, uno dei problemi più importanti è la mancanza di criteri chiaramente definiti per la rimozione i pazienti dalla lista d'attesa a causa della crescita del tumore eccessiva durante l'attesa. Se solo gli eventi

principali (invasione vascolare macroscopica e diffusione extraepatica) vengono utilizzati per far uscire i pazienti dalla lista, questo significa che alcuni pazienti saranno sottoposti a trapianto anche se hanno la malattia avanzata. Quindi in ultima analisi, si mettono in pericolo i dati di sopravvivenza per il trapianto per HCC e l'intero programma a rischio. L'elenco dei pazienti che utilizzano criteri espansi peggiora ulteriormente questo scenario e, quindi, prima di qualsiasi cambiamento nella politica di selezione, è essenziale definire i criteri di esclusione.

A seguito di una richiesta federale, l'UNOS ha sviluppato un sistema di priorità per trapiantare i pazienti con il più alto rischio di mortalità a breve termine. Il punteggio MELD (Model for End stage Liver Disease)^{147, 148} è stato scelto come strumento clinicamente più utile per questo scopo, in quanto predice accuratamente la mortalità precoce nella malattia epatica cronica di origine virale o alcolica.¹⁷¹ MELD utilizza i valori del paziente per la bilirubina, la creatinina sierica, e il rapporto internazionale normalizzato per il tempo di protrombina (INR) per predire la sopravvivenza. Tuttavia, MELD è meno potente nel predire la mortalità nella malattia epatica colestatica e non può predire la mortalità in HCC.

MELD = 3,78 [Ln bilirubina sierica (mg / dL)] + 11,2 [Ln INR] + 9,57 [Ln creatinina sierica (mg / dL)] + 6,43

(cui l'UNOS ha apportato diverse modifiche alla partitura per prevenire il verificarsi di punteggi inferiori a 0 (il logaritmo naturale di 1 è 0, e qualsiasi valore inferiore a 1 produrrebbe un risultato negativo). I pazienti con una diagnosi di cancro al fegato avranno assegnato un punteggio MELD in base a come il tumore è avanzato. A seconda del punteggio MELD nei pazienti ospedalizzati, entro i 3 mesi la mortalità prevista sarà:

Punteggio	Mortalità
>40	71,3%
30-39	52,6%
20-29	19,6%
10-19	6,0%
<9	1,9%

Per dare ai pazienti con HCC pari opportunità per il trapianto, inizialmente sono stati forniti ulteriori punti destinati a coprire il rischio di morte nello stadio terminale della cirrosi: 24 punti per HCC solitario < 2 cm e 29 per i solitari HCC 2 a 5 centimetri o 3 noduli ognuno < 3 cm. Dopo l'attuazione è stato riconosciuto che era troppo alta la priorità che è stata data ai pazienti con carcinoma epatocellulare e questo era ingiusto per i pazienti senza il tumore.¹⁷² Inoltre, è stato riconosciuto che un quinto dei pazienti era in lista con

una diagnosi di HCC, e chi ha ricevuto la priorità non aveva HCC nel fegato espantato. I punti per i pazienti con carcinoma epatocellulare sono stati quindi ridotti a 20 e 29, a nessuno e 24, rispettivamente, e, infine, a nessuno e 22. Inoltre, un aumento di un punto del 10% è dato per ogni tre mesi in lista d'attesa. I risultati della nuova assegnazione punti sono sconosciuti.

L'introduzione di MELD per l'HCC, ha portato ad un aumento del numero di trapianti da effettuare per il tumore. In una recente consensus conference, sono stati proposti nuovi criteri di assegnazione di punti, e la futura politica definisce 3 mesi di tempo di attesa per consentire di rilevare i tumori che progrediscono velocemente e quindi, non trapiantarli. Nonostante tutto, pazienti con HCC non hanno una buona sopravvivenza dopo il trapianto, rispetto ai pazienti con equivalente punteggio MELD senza HCC.^{173, 174}

La difficoltà maggiore nella creazione di politiche prioritarie giuste ed eque è che non ci sono dati predittivi chiari per identificare i pazienti a più alto rischio di progressione e, quindi, di abbandono. I pazienti con progressione durante l'attesa sono chiaramente a rischio più elevato, ma alcuni possono avere tumori più aggressivi. Così, se la priorità è eccessiva, i risultati a lungo termine possono essere non ottimali a causa della recidiva di HCC in quest'ultimo sottogruppo. La ricerca in corso dovrebbe essere in grado di chiarificare alcune di queste questioni fondamentali, e in futuro dovrebbe essere possibile utilizzare i dati clinici e molecolari per prendere decisioni cliniche per quanto riguarda il trapianto in pazienti con HCC noto.

Oltre alla creazione di una politica prioritaria, la maggior parte dei gruppi tratta l'HCC in lista, prima del trapianto. Purtroppo, anche in questo ambito mancano RCT robusti che confrontino l'intervento attivo vs nessuna terapia o diversi interventi tra loro. Tutte le prove dei benefici attualmente disponibili derivano da valutazioni di coorte, di solito utilizzando un protocollo piuttosto che un approccio intention-to-treat, o dalla modellazione Markov utilizzando gli outcomes clinici pubblicati.¹⁷⁵ Nonostante alcuni dati preliminari incoraggianti, più recenti studi di coorte suggeriscono che la chemioterapia sistemica è inefficace.¹⁷⁶ La maggior parte dei gruppi eseguono una chemioembolizzazione transarteriosa mentre sono in lista perché riduce le dimensioni e ritarda la progressione del tumore.¹⁷⁷ Tuttavia, è noto che nei pazienti con malattia scompensata questo trattamento potrebbe indurre insufficienza epatica e morte. Pertanto, non può essere applicato in tutti i candidati. Pazienti con tumori piccoli possono essere sottoposti ad ablazione sia per iniezione percutanea di etanolo, radiofrequenza o qualsiasi altra tecnica e la modellizzazione statistica ha dimostrato che tale intervento è conveniente se il tempo di

attesa previsto è più lungo di 6 mesi.¹⁷⁵ Il problema principale con questo approccio è l'insemenzamento a causa della puntura del tumore, come è stato riportato per la biopsia diagnostica. Tuttavia, l'insemenzamento puntura-correlato è di solito limitato ai tumori scarsamente differenziati e ai tumori periferici che non possono essere affrontati attraverso l'asportazione di un "corona" di fegato non tumorale.¹⁷⁸

L'approccio più efficace per ridurre il tasso di abbandono in lista d'attesa OLT è quello di ampliare il numero di fegati disponibili. A questo scopo sono state stabilite diverse strategie (utilizzare fegati estratti da pazienti con amiloidosi, fegati virali con HIV con danni minimi, split liver transplant, da donatori a cuore non battente), ma la migliore è lo sviluppo della donazione da vivente.¹⁷⁹

Dopo il primo tentativo riuscito,¹⁸⁰ più di 3000 operazioni da donatori viventi sono state eseguite in tutto il mondo utilizzando il lobo epatico destro. I risultati dell'Asia¹⁸¹ e un recente sondaggio in Giappone¹⁸² che include tutti gli interventi eseguiti, suggeriscono che il risultato dopo il trapianto da donatore vivente è lo stesso che con la donazione da cadavere. Stranamente, il valore dei criteri Milano è ulteriormente rinforzato in questo studio, considerato che la sopravvivenza e il tasso di recidiva di malattia in pazienti trapiantati con HCC sono significativamente differenti secondo questa stratificazione. In ogni caso, i dati a lungo termine sono molto attesi. Questo è particolarmente rilevante per i pazienti con infezione da virus dell'epatite C nel quale la potenziale gravità della recidiva di malattia epatica è una questione controversa.¹⁸³ Tenendo conto del rischio di drop-out durante l'attesa (4% al mese), della sopravvivenza attesa del beneficiario (70% a 5 anni) e del rischio per il donatore (0,3% -0,5% di mortalità), le analisi suggeriscono che questo sia un approccio efficace se il tempo di attesa supera i 7 mesi.¹⁸⁴ Tuttavia, questo è un intervento complesso che deve essere intrapreso solo da chirurghi esperti per garantire la più bassa morbilità e miglior risultato, non solo per il ricevente, ma anche per il donatore. Complicanze possono svilupparsi dal 20% al 40% dei donatori e il rischio di mortalità per il donatore è ancora dallo 0,3% al 0,5%.¹⁷⁹ Infine, anche con la donazione d'organo di fegato, il numero di donatori è limitato a causa della incompatibilità di gruppo sanguigno, di controindicazioni mediche o di problemi psicosociali.

Lo sviluppo della donazione da vivente ha ulteriormente stimolato la discussione circa l'espansione dei limiti per i pazienti con carcinoma epatocellulare. Dal momento che il trapianto può essere fatto con quasi nessun ritardo e la stadiazione sarebbe recente, diversi programmi hanno proposto che la donazione da vivente potrebbe essere una soluzione valida per quei pazienti il cui stadio del tumore non permette di rimanere in lista per il

trapianto di fegato da cadavere. Fegati da cadavere sarebbero poi ripartiti per i pazienti con il miglior risultato potenziale (70% a 5 anni), e di quelli donati da viventi beneficerebbero i pazienti con un'aspettativa più bassa, circa il 50% a 5 anni. Non ci sono dati che supportino l'utilizzo di tali criteri espansi.

Non ci sono dati sufficienti per sostenere o scoraggiare qualsiasi tipo di immunosoppressione volto a diminuire la crescita di nidi tumorali diffusi non riconosciuti prima dell'operazione. Allo stesso modo, anche se la patologia presenta invasione vascolare che indica un alto rischio di recidiva di HCC, non vi è alcun intervento efficace per prevenire o diminuire questo sfortunato evento. L'unico aspetto che può essere impedito mediante trattamento, è la reinfezione virale dell'innesto. Ci sono diverse strategie efficaci per l'epatite B,¹⁸⁵ ma in pazienti con epatite C la situazione è meno incoraggiante. Il tasso di risposta nei pazienti che possono ricevere la terapia combinata con interferone peghilato e ribavirina è ridotta rispetto alla situazione pre-trapianto.¹⁸⁶ Se la replicazione virale persiste, nel nuovo fegato si svilupperà un'infezione che provocherà gravi danni che portano alla cirrosi in un numero consistente di pazienti e influenzerà sia l'innesto che la sopravvivenza del paziente.¹⁸⁶ Pertanto, l'obiettivo che il trapianto può curare sia il tumore che il fegato sottostante, non può essere realizzato, almeno nella maggioranza dei pazienti con HCC in Giappone, Stati Uniti ed Europa, dove l'epatite C è la causa principale del carcinoma epatocellulare.

6.2 Ablazione o resezione chirurgica

La resezione chirurgica è il trattamento di scelta per il carcinoma epatocellulare nei pazienti non cirrotici, che rappresentano solo il 5% dei casi nei paesi occidentali, e circa il 40% in Asia. Questi pazienti tollerano grandi resezioni con bassa morbidità, ma nella cirrosi i candidati alla resezione devono essere accuratamente selezionati per ridurre il rischio di insufficienza epatica postoperatoria con conseguente aumento del rischio di morte. L'epatectomia destra in pazienti cirrotici ha un più alto rischio di scompenso rispetto a quella che può indurre un'epatectomia sinistra. Due decenni fa, la sopravvivenza a lungo termine è stata raramente raggiunta dalla resezione. Oggi, invece, la sopravvivenza a 5 anni dopo resezione può superare il 50%.^{187, 188}

Diversi grandi progressi hanno aumentato la sopravvivenza a lungo termine. La diagnosi durante la fase asintomatica della malattia insieme ad una più accurata stadiazione dei pazienti, ha permesso l'identificazione di pazienti con malattia in fase iniziale. Allo stesso tempo, una più accurata valutazione della funzione epatica di base ha permesso l'esclusione

di quelli in cui la resezione sarebbe verosimilmente seguita da scompenso epatico e morte. Per anni la selezione dei candidati per la resezione è stata basata sulla classificazione di Child-Pugh, ma questa è nota per avere un valore predittivo incoerente. Pazienti con Child-Pugh A possono già avere una significativa compromissione della funzione epatica con aumento della bilirubina, significativa ipertensione portale, o anche ritenzione idrica minore che richiede comunque una terapia con diuretico. Queste caratteristiche indicano una malattia epatica avanzata e precludono la resezione. Molti gruppi giapponesi si basano sulla prova di ritenzione con indocianina verde. La decisione se la chirurgia sia fattibile, e l'estensione della resezione che può essere eseguita, viene effettuata sulla base del grado di ritenzione del colorante.¹⁸⁹ Al contrario, in Europa e negli Stati Uniti, la selezione dei candidati ottimali alla resezione è di solito basata sulla valutazione della presenza di ipertensione portale, valutata clinicamente o tramite cateterizzazione della vena epatica. Studi hanno dimostrato che una normale concentrazione di bilirubina, e l'assenza di ipertensione portale clinicamente significativa misurata con la cateterizzazione della vena epatica (gradiente di pressione della vena epatica <10 mmHg) sono i migliori predittori di esiti eccellenti dopo l'intervento chirurgico, con quasi nessun rischio per l'insufficienza epatica postoperatoria.¹⁹⁰ Tali pazienti non si scompenseranno dopo la resezione e possono raggiungere una sopravvivenza a 5 anni del 70%. Di contro, la maggior parte dei pazienti con significativa ipertensione portale svilupperà uno scompenso post-operatorio (per lo più ascite),¹⁹⁰ con una sopravvivenza a 5 anni inferiore al 50%. Infine, la sopravvivenza di quei soggetti con entrambi i fattori predittivi negativi (ipertensione portale e aumento della bilirubina) è inferiore al 30% a 5 anni, a prescindere dal loro stadio Child-Pugh. Pertanto, la misurazione della pressione portale è un passo fondamentale nella valutazione dei candidati alla resezione. Ovviamente, se l'endoscopia del tratto digestivo superiore mostra varici o se è necessario il trattamento diuretico per controllare l'ascite, l'ipertensione portale è già grave e il cateterismo non è necessario. L'ipertensione portale clinicamente significativa può anche essere sospettata quando la conta delle piastrine è inferiore a 100.000/mm³ associato a significativa splenomegalia.

L'utilità della misurazione della pressione portale di prevedere l'esito dei pazienti e definire candidati ottimali per la resezione è stato convalidato in uno studio giapponese. Questo conferma che la resezione deve rimanere la prima opzione per i pazienti che hanno il profilo ottimale, come definito dal sistema di stadiazione BCLC. Così, sebbene la resezione possa essere eseguita in alcuni di questi pazienti con malattia epatica avanzata, la

mortalità è più alta e questi pazienti potrebbero essere trattati meglio con un trapianto di fegato o con l'ablazione termica.

Negli ultimi anni, i chirurghi hanno affinato sia criteri di selezione che le tecniche chirurgiche. Quindi, la trasfusione di sangue può essere necessaria in meno del 10% dei casi e la mortalità correlata al trattamento deve essere inferiore a 1%-3%.^{189, 191} L'uso dell'ecografia intra-operatoria (IOUS) permette la localizzazione precisa e la stadiazione del tumore, e permette anche l'esecuzione di resezioni anatomiche. Da una prospettiva oncologica le resezioni anatomiche che possono includere lesioni satelliti sono più “risonanti” delle resezioni limitate, senza un margine circostante. Gli studi patologici nei tumori resecati forniscono il supporto per questo “progetto”¹¹⁸ ma alcuni autori hanno messo in discussione i benefici di un margine di sicurezza¹⁹² e manca una consistente evidenza. La maggior parte dei gruppi restringono l'indicazione alla resezione a pazienti con tumore singolo in una posizione idonea per la resezione (come mostrato dalla scansione trifasica TC, RM, o altre tecniche di imaging ad alta risoluzione). La dimensione del tumore non è un fattore limitante chiaro. Come discusso in precedenza, il rischio di invasione vascolare e di diffusione aumenta con le dimensioni,¹¹⁸ ma alcuni tumori possono crescere come un'unica grande massa senza evidenza di invasione. In questi, la chirurgia può essere eseguita in modo sicuro e il rischio di recidiva non è significativamente aumentato rispetto ai tumori più piccoli.¹⁹³

La chemioembolizzazione del tumore prima della resezione non offre alcun beneficio.¹⁹⁴ Lo stesso vale per l'uso generale dell'embolizzazione della vena del lobo epatico che ospita il tumore¹⁹⁵ a indurre la crescita compensatoria del fegato e della capacità funzionale nel lobo non interessato prima di una resezione maggiore. È stato inoltre suggerito che anche gli epatociti maligni possono rispondere allo stimolo proliferativo e questo potrebbe causare la progressione incontrollata del tumore. Inoltre, l'ostruzione della vena porta può indurre un aumento acuto della pressione portale e causare sanguinamento delle varici. Chiaramente, sono necessari ampi studi randomizzati per definire i benefici e i rischi di queste procedure.

Dopo la resezione del tumore, il tasso di recidiva a 5 anni supera il 70%,¹⁹⁶ compresa la recidiva a causa della diffusione e di nuova insorgenza del tumore.¹⁹⁷ I più potenti predittori di recidiva sono la presenza di invasione microvascolare e/o i siti tumorali aggiuntivi oltre la lesione primaria.¹⁹⁸ Questo suggerisce che la maggior parte delle recidive siano dovute alla diffusione del tumore primario e non a tumori metacroni sviluppati in un fegato con cirrosi.¹⁹⁹ Inoltre, la recidiva a causa della disseminazione è più

probabile che si verifichi durante i primi 3 anni di follow-up. Non esiste una terapia adiuvante efficace in grado di ridurre il tasso di recidive.²⁰⁰ La chemio-embolizzazione preoperatoria o la chemioterapia adiuvante non sono efficaci e possono complicare l'intervento. La radioterapia interna²⁰¹ e l'immunoterapia adottiva di linfociti attivati²⁰² possono avere qualche efficacia anti-tumorale, ma i primi risultati promettenti devono ancora essere adeguatamente convalidati. Questo è anche il caso della terapia con retinoidi²⁰³ e di quella con interferone.²⁰⁴

L'interferone alfa è stato utilizzato per cercare di evitare la recidiva post resezione.²⁰⁵ Una recente meta-analisi di studi pubblicati²⁰⁶ ha riscontrato che il trattamento post-resezione con interferone ha ridotto il rischio di recidiva di HCC. Tuttavia, Non è chiaro se questo risultato sia indipendente dall'effetto di soppressione virale o eradicazione virale. Pertanto, l'interferone non può ancora essere raccomandato come una generale forma di trattamento dopo la resezione dell'HCC. Come sperato in tutti i tumori, il profilo molecolare del carcinoma epatocellulare è atteso per affinare la valutazione dei rischi e diversi studi sono stati pubblicati cercando di correlare l'espressione del gene anomalo con la recidiva e l'outcome.²⁰⁷⁻²⁰⁹ tuttavia, nessuno dei marcatori proposti ha guadagnato ampi consensi nel diventare di routine nella pratica clinica.²¹⁰

Il trattamento della recidiva è un qualcosa ancora scarsamente indagato. La recidiva solitaria potrebbe beneficiare di ripetere la resezione, ma nella maggior parte dei pazienti, la recidiva dopo resezione primaria sarà multifocale a causa della diffusione intraepatica del tumore primario.^{198, 211} Questo riflette uno stadio tumorale avanzato e non vi è alcuna prova che qualsiasi trattamento fornisca un vantaggio in termini di sopravvivenza. E' stato suggerito che i pazienti con recidiva potrebbero essere candidati per il trapianto.²¹² Alcune analisi retrospettive hanno suggerito che la maggior parte dei pazienti con recidiva potrebbe beneficiare di questa opzione.²¹¹ Tuttavia, questo suggerimento ottimista non è supportato da un'analisi di esiti clinici. La maggior parte delle recidive e specialmente quelle che appaiono presto nel corso del follow-up sono causa di diffusione del tumore e hanno un pattern biologico più aggressivo rispetto al tumore primario.¹⁹⁸ Quindi, solo in quei pazienti in cui la ricorrenza è dovuta ad un nuovo tumore si può aspettare di beneficiare di salvataggio con il trapianto o con una nuova resezione. Dal momento che i fattori predittivi più accurati di recidiva a causa della diffusione (invasione vascolare, satelliti) possono essere identificati sulla base dello studio patologico, e dal momento che i risultati del trapianto in questi pazienti sono buoni, alcuni autori hanno proposto che questa categoria di pazienti dovrebbe essere messa in lista immediatamente dopo la resezione.²¹³

Questo potrebbe essere più efficace rispetto all'attesa di sviluppare la recidiva, e quindi un eccessivo carico tumorale, tale da escludere l'eventuale trapianto di fegato. Politiche di assegnazione dell'organo potrebbero dover essere modificate per tener conto di questi risultati.

Quindi i pazienti che hanno una singola lesione possono essere sottoposti a resezione chirurgica se non sono cirrotici o con cirrosi, ma hanno ancora ben conservata la funzione epatica, bilirubina normale e gradiente di pressione della vena epatica <10 mm Hg; la terapia adiuvante pre o post-resezione non è raccomandata.

6.3 Ablazione percutanea

Questa è la migliore opzione di trattamento per i pazienti con HCC in fase iniziale che non sono adatti per la resezione o trapianto. In alcuni centri giapponesi è offerta come prima opzione terapeutica. Ci sono RCT che confrontano l'ablazione locale alla resezione. La distruzione delle cellule tumorali può essere ottenuta mediante l'iniezione di sostanze chimiche (Etanolo, acido acetico, soluzione salina in ebollizione) oppure modificando la temperatura (radiofrequenza, microonde, laser, crioterapia).

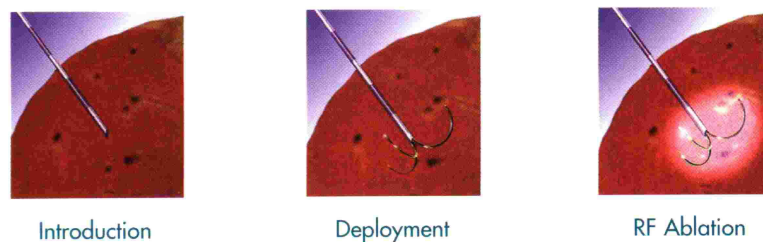


Figura 15. Rappresentazione schematica di come viene effettuata l'ablazione a radiofrequenza.

L'efficacia dell'ablazione percutanea viene valutata dalla TC dinamica 1 mese dopo la terapia. Sebbene non completamente affidabili, l'assenza di captazione del mezzo di contrasto all'interno del tumore riflette la necrosi tumorale, mentre la persistenza di captazione indica il fallimento del trattamento. Il tasso di recidiva dopo l'ablazione è alto come per la resezione. Alcune recidive si verificano in prossimità del nodulo trattato e sono dovute alla presenza di satelliti microscopici non compresi nella zona di ablazione.

L'ablazione percutanea è di solito eseguita sotto guida ecografica. L'iniezione di etanolo è l'approccio più conosciuto e meglio studiato.²¹⁴ E' molto efficace per i piccoli HCC e ha un basso tasso di effetti avversi. Inoltre, è poco costoso. Questo dovrebbe essere lo standard rispetto al quale ogni nuova terapia dovrebbe essere confrontata. L'iniezione di etanolo raggiunge un tasso di necrosi del 90-100% del lesione minore di 2 cm, che viene ridotto al

70% nei tumori tra 2 e 3 cm e al 50% negli HCC tra 3 e 5 cm.²¹⁵ Studi a lungo termine indicano che pazienti con Child-Pugh A, con successo di necrosi del tumore, possono raggiungere una sopravvivenza del 50% a 5 anni.¹⁸⁷ Questo regge bene al confronto con il risultato di resezione per quei candidati che non rientrano nel profilo chirurgico. L'iniezione ottimale di etanolo richiede iniezioni ripetute in giorni separati e raramente porta alla necrosi completa in tumori più grandi di 3 cm, perché l'etanolo iniettato non può accedere a tutto il volume del tumore. Ciò può essere dovuto alla presenza di setti intratumorali. Per interrompere i setti e facilitare l'infiltrazione di etanolo, alcuni autori hanno proposto che l'iniezione di etanolo venga preceduta da un'embolizzazione arteriosa nei grandi HCC.²¹⁶ Il tasso di risposta iniziale è maggiore, ma lo sviluppo di validi nidi intratumorali o di recidiva a distanza è la regola durante il follow-up e la prognosi a lungo termine non è diversa. Così, ci sono stati grandi sforzi per sviluppare tecniche ablative alternative che sarebbero in grado di determinare la necrosi in tumori di dimensioni maggiori in un minor numero di sedute di trattamento.

L'ablazione con radiofrequenza (RFA) è l'opzione che ha risultati migliori in tal senso. L'inserimento di singoli o multipli elettrodi raffreddati sulla punta o elettrodi singoli con aghi J-uncinati che forniscono il calore attorno alla punta, induce un'ampia regione di necrosi tumorale. L'efficacia di RFA nei tumori < 2 cm è simile a quella di etanolo ma richiede meno sessioni di cura.²¹⁷ L'efficacia in tumori > 2 cm è migliore che con l'etanolo.²¹⁸ RCT hanno dimostrato che RFA fornisce un migliore controllo della malattia locale che potrebbe tradursi in un miglioramento della sopravvivenza.²¹⁹ Tuttavia sono necessari grandi studi RCT che confrontino queste due opzioni in tumori < 2 cm per valutare la sopravvivenza.

Il principale inconveniente della radiofrequenza è il suo costo elevato e il tasso maggiore (fino al 10%) di eventi avversi (versamento pleurico, emorragia peritoneale).^{220, 221} La mortalità legata alla procedura varia da 0% a 0,3%.^{220, 221} La posizione sottocapsulare e la scarsa differenziazione del tumore sono stati associati con un aumentato rischio di insembramento peritoneale¹⁷⁸ e, quindi, questi tipi di tumore non devono essere trattati con RFA. Dal momento che l'efficacia della radiofrequenza si basa sul calore e la circolazione del sangue all'interno del tumore potrebbe impedire il corretto riscaldamento, alcuni autori hanno proposto di combinare la radiofrequenza con una simultanea ostruzione del vaso.²²² Questa manovra può aumentare l'area di necrosi, ma la mancanza di evidenza di un beneficio maggiore, insieme alla complessità elevata del processo, ha impedito la sua ampia utilizzazione.

Nuovi studi hanno ulteriormente confermato le precedenti raccomandazioni. Una meta-analisi cumulativa ha suggerito che la sopravvivenza è migliore dopo RFA che dopo l'iniezione di etanolo.²²³ Come precedentemente menzionato, i dati di uno studio multicentrico in Italia che ha incluso pazienti con lesioni HCC < 2 cm soggette a RFA hanno mostrato una sopravvivenza a 5 anni del 70%, paragonabile a quella della resezione chirurgica in candidati ottimali.²²⁴ Questo fornisce la base per un grande studio controllato, randomizzato, di confronto tra le due opzioni, che si sta sviluppando in Giappone. Si spera, fornirà una risposta definitiva per la gestione di questi pazienti. Uno studio recente di confronto della combinazione di chemioembolizzazione e radiofrequenza ha suggerito che quest'approccio ha offerto un miglioramento della sopravvivenza rispetto alla chemioembolizzazione o alla sola ablazione.³³ Tuttavia, questo articolo è stato ritirato. Un piccolo studio controllato randomizzato di confronto resezione con l'ablazione a radiofrequenza è stato pubblicato.²²⁵ A causa delle limitazioni di dimensione del campione e l'inserimento di una miscela di candidati con differenti stadi di malattia, i dati suggeriscono risultati equivalenti con entrambe le opzioni, non fornisce sufficienti prove per favorire l'ablazione come prima opzione in pazienti che sono anche candidati alla chirurgia. Infatti, mentre la resezione assicura la rimozione completa del tumore di qualsiasi dimensione, l'ablazione ha una quota significativa di fallimenti in HCC lesioni più grandi di 2-3 cm di grandezza. Quindi, l'accettazione dell'ablazione come opzione di trattamento di prima linea è ancora controversa. I dati riportati da *Livraghi et al.*²²⁴ in uno studio di coorte con più di 200 pazienti con il profilo ottimale per la resezione dovrebbero essere confermati da altri gruppi prima di ritenere l'ablazione come primo approccio per il “very early HCC”.

L'ablazione locale è una terapia sicura ed efficace per pazienti che non possono essere sottoposti a resezione o come ponte al trapianto.

L'iniezione di etanolo e la radiofrequenza sono ugualmente efficaci per i tumori < 2 cm. Tuttavia, l'effetto necrotico della radiofrequenza è più prevedibile in tutte le dimensioni del tumore e in aggiunta, la sua efficacia è nettamente superiore a quella di iniezione di alcol in tumori più grandi.

6.4 Embolizzazione e chemioembolizzazione transarteriosa

HCC presenta intensa attività neo-angiogenetica nel corso della sua progressione. Allo stadio di “very early” il tumore non è altamente vascolarizzato e il suo apporto di sangue proviene dalla vena porta. Con la crescita l'apporto di sangue arterializzato diventa

progressivamente maggiore, in modo che anche l'HCC ben differenziato dipenda principalmente dall'arteria epatica. Questa caratteristica fornisce la base patologica per le evidenze radiologiche utilizzate per diagnosticare la malattia. Esso inoltre spiega i motivi per sostenere l'embolizzazione arteriosa come opzione terapeutica efficace. Infatti, l'ostruzione arteriosa acuta induce una necrosi ischemica del tumore con un alto tasso di risposte obiettive. L'ostruzione dell'arteria epatica viene effettuata nel corso di una procedura angiografica ed è conosciuta come embolizzazione arteriosa transcatetere (TAE). Quando la TAE è combinata con la precedente iniezione nell'arteria epatica di agenti chemioterapici, solitamente miscelati con lipiodol, la procedura è nota come chemioembolizzazione (TACE). L'ostruzione dell'arteria epatica può essere ottenuta mediante l'iniezione o il posizionamento dei diversi agenti. Il Gelfoam accuratamente preparato come cubetti di 1 millimetro è l'agente più frequentemente utilizzato, ma anche alcol polivinilico, alcool,²²⁶ microsfere di amido.²²⁷ Sono stati utilizzati anche coils metallici²²⁸ o coaguli di sangue autologo.²²⁹ Il gelfoam polvere non deve essere utilizzato in quanto ciò potrebbe causare un danno biliare.²³⁰ La procedura richiede l'avanzamento del catetere nell'arteria epatica e poi alle filiali lobare e segmentale che mirano a essere più selettive possibile, in modo da danneggiare meno possibile il fegato circostante non interessato dal tumore. Un HCC multifocale che coinvolge entrambi i lobi epatici può richiedere l'ostruzione del flusso sanguigno epatico totale dell'arteria. La chemioterapia deve essere iniettata prima dell'ostruzione arteriosa. Si è soliti sospendere la chemioterapia in lipiodol, un mezzo di contrasto oleoso usato per gli studi linfografici. Il lipiodol è selettivamente trattenuto all'interno del tumore e questo espande l'esposizione delle cellule neoplastiche alla chemioterapia. La dose di chemioterapia da somministrare deve essere distribuita tra i lobi colpiti. Se il tumore colpisce un solo lobo, è prassi comune iniettare il 25% dell'agente nel lobo libero dal tumore con l'obiettivo del trattamento di potenziali cloni non rilevati. Diversi agenti chemioterapici sono stati utilizzati per la TACE, ma i più comuni sono adriamicina o cisplatino.²³¹

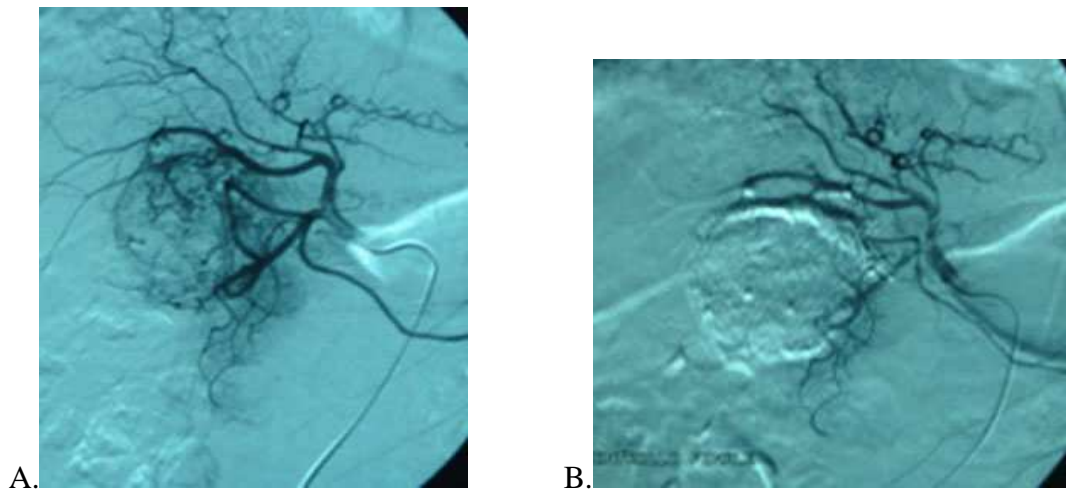


Figura 16. A. Cateterismo selettivo dell'arteria epatica e iniezione intrarteriosa di mezzo di contrasto; si visualizza la grande lesione tondeggiante riccamente vascolarizzata. B. Necrosi ischemica dopo chemioembolizzazione; la selettività del trattamento risparmia il tessuto sano.

TAE e TACE sono considerati per i pazienti con HCC non resecabile chirurgicamente che sono anche inelleggibili per l'ablazione percutanea, a condizione che non vi sia alcuna diffusione tumorale extraepatica. La controindicazione principale è la mancanza di flusso di sangue portale (a causa della trombosi della vena porta, anastomosi porto-sistemica o flusso epatofugo). I pazienti con trombosi lobare o della vena porta segmentale non sono ottimi candidati per la TACE, perchè determinerebbe la necrosi del tumore e del fegato non tumorale privati dell'approvvigionamento di sangue, e di conseguenza aumenterebbe il rischio di morte correlato al trattamento a causa dell'insufficienza epatica. I pazienti con malattia epatica avanzata (classe Child-Pugh B o C) e/o sintomi clinici di cancro in fase terminale, non devono essere considerati per questi trattamenti in quanto hanno già di per sé un aumentato rischio di insufficienza epatica e morte. Gli effetti collaterali di iniezione intra-arteriosa di chemioterapia sono gli stessi che per la somministrazione sistemica: nausea, vomito, depressione del midollo osseo, alopecia e, potenzialmente, insufficienza renale. L'ostruzione dell'arteria epatica con ischemia acuta del HCC è associata con la cosiddetta sindrome post-embolizzazione. Ciò appare in più del 50% dei pazienti e consiste nella comparsa di febbre, dolore addominale e un grado moderato di ileo. È richiesto il digiuno per 24 ore e l'idratazione IV è obbligatoria. La profilassi con antibiotici non è usata di routine.²³² La febbre è un riflesso di necrosi tumorale, ma una minoranza di pazienti possono sviluppare gravi complicanze infettive come ascesso epatico o colecistite. La sindrome post-embolizzazione è di solito autolimitante e in meno di 48 ore il paziente può essere dimesso dall'ospedale.

Sia la TAE che la TACE inducono estesa necrosi tumorale in più del 50% dei pazienti¹⁵⁴ la risposta al trattamento viene valutata dalla diminuzione della concentrazione di markers tumorali e dall'individuazione di grandi aree necrotiche intra-tumorale e dalla riduzione del tumore alla TC dinamica o RM. Subito dopo l'ostruzione arteriosa è possibile vedere le bolle intra-tumorali che riflettono la liquefazione del tessuto. La valutazione della risposta al trattamento deve tener conto dell'induzione di aree necrotiche intra-tumorali nella stima della diminuzione del tumore, e non solo una riduzione complessiva delle dimensioni. Il fatto che i criteri RECIST non definiscano l'estensione della necrosi, ha indotto la modifica della valutazione dell'efficacia terapeutica attraverso la registrazione della riduzione del tumore vitale.^{106, 233} Secondo i criteri convenzionali dell'WHO la frequenza di risposte oggettive varia tra il 16% e il 60%,¹⁵⁴ non essendoci differenze tra TAE e TACE. Meno del 2% dei pazienti trattati raggiunge una risposta completa. Durante il follow-up i nidi tumorali residui recuperano il loro apporto di sangue e il tumore continua a crescere. Questa considerazione richiede la ripetizione del trattamento a intervalli regolari o "à la demande", e non c'è confronto prospettico per sostenere l'una o l'altra strategia.²³¹

Il tasso di progressione del tumore è ridotto dopo il trattamento e questo si traduce in un minor rischio di invasione vascolare. La risposta al trattamento è associata ad un miglioramento significativo in termini di sopravvivenza. Una metanalisi cumulativa di tutti gli RCT pubblicati indica che la sopravvivenza del paziente è significativamente migliorata. Fino a poco tempo fa, il guadagno in termini di sopravvivenza riportato nelle singole prove non era statisticamente significativo.²³⁴ Tuttavia, studi effettuati a Barcellona²³⁵ e ad Hong Kong²³⁶ che segnalano un impatto significativo sulla sopravvivenza hanno cambiato questa dichiarazione negativa. Deve essere sottolineato che le prove disponibili sono eterogenee sia in termini del profilo dei pazienti, sia di programma di trattamento e di agente utilizzato. Così, è ancora da determinare quali siano i migliori agenti che ostruiscono, gli agenti chemioterapici ottimali e il più efficace programma di ritrattamento. Il miglioramento della sopravvivenza nei pazienti trattati varia dal 20% al 60% a 2 anni, ma è chiaro che la rilevanza del miglioramento rispetto al loro out-come se non trattati, è in gran parte dipendente dalle caratteristiche basali dei pazienti per quanto riguarda lo stadio del tumore, la funzione epatica e lo stato generale di salute.

Per i pazienti che hanno fallito la TACE, o che presentano un HCC più avanzato nuovi dati indicano l'efficacia di sorafenib nel prolungare la vita. Sorafenib è un inibitore delle chinasi con attività riportata contro Raf-1, B-Raf, VEGFR2, PDGFR, recettori c-Kit, tra gli altri recettori tirosina chinasi serina e treonina chinasi.²³⁷ Uno studio di fase II che

coinvolge 137 pazienti con carcinoma epatocellulare avanzato ha dimostrato che sorafenib ha indotto risposte parziali in meno del 5% di pazienti, ma la sopravvivenza mediana osservata di 9,2 mesi e il tempo mediano alla progressione di 5,5 mesi fornisce la base per sviluppare un grande studio controllato randomizzato placebo (SHARP).²³⁸ Questo studio includeva 602 pazienti con carcinoma epatocellulare avanzato, ed è stato fermato all'analisi a causa di vantaggi in termini di sopravvivenza favorendo sorafenib (n=299) rispetto al placebo (n=303). Sulla base di 321 morti, l'hazard ratio sorafenib/placebo era 0,69 (IC 95%: 0,55, 0,86; $p=0.0005$), che rappresenta una diminuzione del 31% del rischio di morte con un sopravvivenza mediana nel braccio di Sorafenib di 10,7 mesi vs 7,9 mesi per il placebo. Inoltre, sorafenib ha mostrato un vantaggio significativo in termini di tempo alla progressione (TTP) con un TTP mediano di 5,5 mesi per il sorafenib e di 2,8 mesi per il placebo. I più frequenti eventi avversi sono stati diarrea, affaticamento, perdita di peso e reazione cutanea mano-piede. Eventi avversi di grado 3/4 come la diarrea (sorafenib vs placebo: 11% vs 2%) e la reazione cutanea mano-piede (8% vs 1%) sono risultati più frequenti con sorafenib. La sospensione del farmaco a causa degli eventi avversi di sorafenib si è verificata nel 11%, ma gli eventi avversi legati al farmaco sono stati considerati gestibili e non si è verificato nessun decesso tossicità correlata. La grandezza del miglioramento della sopravvivenza si confronta con altre terapie molecolari mirate stabilite per tumori avanzati del polmone, del colon, della mammella o del pancreas.^{104, 239} L'efficacia di sorafenib nel carcinoma epatico è stata riprodotta in uno studio controllato verso placebo randomizzati che include per lo più pazienti con HCC HBV-correlato.²⁴⁰ Come risultato, il sorafenib è ormai affermato come trattamento di prima linea in pazienti con HCC che non possono più essere trattati con terapie potenzialmente più efficaci. Lo Studio SHARP includeva solo pazienti con funzione epatica conservata (Child-Pugh A). Dati in Child-Pugh B sono scarsi. Il profilo farmacocinetico di sorafenib è simile nella Child-Pugh A e B. Studi di coorte hanno suggerito che l'effetto antitumorale (progressione del tumore) e il profilo di sicurezza sono anch'essi simili. Tuttavia, in assenza di elementi solidi, la possibilità per il miglioramento della sopravvivenza nei pazienti Child-Pugh B deve essere attentamente valutata prima di iniziare il trattamento. Chiaramente, i pazienti che potrebbero essere candidati per il trapianto di fegato a causa della ridotta funzione e che hanno una prognosi infausta a breve termine non avranno un significativo guadagno nell'aspettativa di vita dal trattamento con sorafenib.

TACE è raccomandata come terapia non-curativa di prima linea per i pazienti non candidati alla chirurgia con HCC grandi o multifocali che non presentano invasione

vascolare o diffusione extra-epatica. Il sorafenib è raccomandato come opzione di prima linea in pazienti che non beneficiano della resezione, del trapianto, dell'ablazione o della TACE e con funzione epatica ancora conservata. Il tamoxifene, gli antiandrogeni, l'octreotide o la legatura/embolizzazione dell'arteria epatica non sono raccomandati. Altre opzioni, come le perle di vetro radio-marcate con ittrio, il lipiodol radio-marcato o l'immunoterapia non possono essere raccomandati come terapia standard per l'HCC avanzato al di fuori di studi clinici. La radioembolizzazione con perle di vetro marcato con ittrio 90 ha dimostrato di indurre una vasta necrosi tumorale con un profilo di sicurezza accettabile. Tuttavia, lì non esistono studi che dimostrano un impatto sulla sopravvivenza e di conseguenza, il suo valore in ambito clinico non è stato stabilito e non può essere raccomandato come terapia standard per il carcinoma epatico avanzato al di fuori di studi clinici. La chemioterapia sistemica o selettiva intra-arteriosa non è raccomandata e non dovrebbe essere usata come standard di cura.

6.5 Trattamenti palliativi, non curativi

Come discusso in precedenza, il punto finale della terapia è quello di prolungare l'aspettativa di vita. L'unico modo per dimostrare questo per qualsiasi opzione terapeutica è quello di eseguire un RCT, adeguatamente supportato, confrontando l'intervento attivo versus nessun trattamento. Vi sono alcuni dati che dimostrano come l'eziologia della cirrosi e dell'HCC sia in grado di condizionare alcune caratteristiche biologico-cliniche della neoplasia. La chemioterapia sistemica con qualsiasi degli agenti disponibili presenta un'attività anti-tumorale marginale e nessun impatto sulla sopravvivenza.²⁴¹ Nonostante questa mancanza di efficacia e la morbidità ad essa associata, la chemioterapia (solitamente doxorubicina) è frequentemente somministrato nella pratica clinica convenzionale. Inoltre, è anche talvolta usata come braccio di controllo in alcuni studi di ricerca. Questa politica deve essere scoraggiata, in quanto se un trattamento è pensato per essere inattivo e utilizzato come un placebo, dovrebbe almeno non essere tossico e facile da amministrare. Infatti, in assenza di terapia efficace, l'obiettivo degli operatori sanitari dovrebbe essere quello di evitare inutili sofferenze con compromissione della qualità della vita. La somministrazione intra-arteriosa selettiva di qualsiasi agente chemioterapico, spesso sospesa in lipiodol, ha anche attività anti-tumorale trascurabile e dati solidi di supporto a beneficio della sopravvivenza sono assenti.¹⁵⁴ La radioembolizzazione transarteriosa (TARE), attraverso l'iniezione intra-arteriosa di microsfele di lipiodol, in passato marcate

con I-131¹⁵⁶, oggi con ittrio-90²⁴², ha una certa attività antitumorale, ma non è stato ancora stabilito l'impatto sulla sopravvivenza.

Ci sono diverse altre modalità di trattamento, come l'octreotide,¹⁵⁸ interferone,²⁴³ radiazioni esterne,²⁴⁴ Tamoxifene,²⁴⁵ o la terapia antiandrogena,²⁴⁶ ma nessuno ha dimostrato di migliorare la sopravvivenza. Gli epatociti normali e quelli iperplastici e neoplastici sono suscettibili all'azione degli ormoni sessuali²⁴⁷. In particolare l'epatocarcinoma esprime recettori per gli estrogeni nel 50-100% dei casi; su questa base da alcuni anni i farmaci anti-estrogeni e in particolare il tamoxifene, sono stati proposti ed utilizzati per il trattamento dell'epatocarcinoma. I primi studi che testavano il tamoxifene hanno portato risultati incoraggianti²⁴⁸ ma, purtroppo, un più grande studio RCT ha mostrato inequivocabilmente la negatività dei risultati. Studi condotti allo scopo di verificare il motivo di queste discrepanze nei risultati terapeutici hanno permesso di identificare varianti del recettore per gli estrogeni²⁴⁹. Nel fegato è stata riscontrata una prevalenza del recettore mutato più elevata negli uomini rispetto alle donne ($p=0.029$) e nei soggetti con infezione da HBV rispetto a quelli anti-HCV positivi. Tale distribuzione è simile sia nello stadio precoce della malattia epatica (epatite cronica) sia nelle cellule displastiche e nell'epatocarcinoma. Ciò suggerisce che l'alterazione dei recettori per gli estrogeni possa favorire una proliferazione cellulare incontrollata e quindi contribuire all'epatocarcinogenesi, soprattutto nel sesso maschile e nei soggetti con infezione da HBV. L'assenza di effetto si mantiene anche quando somministrato ad alte dosi²⁵⁰ e, quindi, il tamoxifene non ha alcuna attività in pazienti con HCC. Alcuni autori hanno suggerito che i pazienti con i recettori degli estrogeni mutati, che non possono quindi essere bloccati dal tamoxifene, vadano trattati con il megestrol.²⁵¹ Ancora una volta, il piccolo numero di pazienti in cui tale agente è stato testato impedisce qualsiasi conclusione certa.

6.6 Verifica dell'efficacia del trattamento e monitoraggio

L'efficacia del trattamento è di solito controllata radiologicamente ed indicata dalla mancanza di enhancement vascolare nella lesione trattata. La ricorrenza di tumore, nella zona trattata o altrove, è definita come ricomparsa di enhancement vascolare.¹⁶⁷ Così, dopo il trattamento, il monitoraggio deve essere eseguito con l'imaging contrastografico utilizzando TC o RMN. Non esistono dati per indicare la superiorità di una modalità rispetto all'altra. Nei pazienti in cui il livello di AFP nel siero era elevato prima del trattamento, e nei quali poi l'AFP è tornata alla normalità dopo la terapia, un conseguente aumento della AFP può segnalare la possibilità di recidiva di HCC²⁵². Tuttavia, questo non

è affidabile e il monitoraggio dei livelli di AFP dopo la terapia non sostituisce l'imaging. L'intervallo di imaging ideale è sconosciuto, ma inizialmente si utilizza comunemente un intervallo di 3-4 mesi per monitorare le lesioni di HCC dopo il trattamento iniziale. Dopo circa 2 anni di sopravvivenza libera da recidive, l'intervallo di follow-up dell'imaging e degli esami può essere meno frequente.

Dopo un trattamento ablativo (chirurgico recettivo o locoregionale) è indicato:

1. controllo TC / RM a 1 mese per la verifica dell'efficacia;
2. successivo controllo trimestrale nel primo anno (utilizzando ECO+m.d.c./TC/RMN in base al tipo di trattamento effettuato e alle caratteristiche delle lesioni trattate), onde escludere la ripresa o progressione di malattia (nuove lesioni, interessamento vascolare);
3. per trattamenti con potenziale significativo impatto sulla riserva funzionale epatica è indicato monitoraggio ravvicinato degli indici funzionali (nei giorni immediatamente successivi alla procedura, a 2 e 4 settimane e quindi a tre mesi);
4. Per i pazienti trattati con Sorafenib è richiesto un monitoraggio clinico strumentale ravvicinato onde documentare (in occasione di ogni prescrizione mensile) l'assenza di severi effetti collaterali e di progressione di malattia (compromissione funzionale epatica / scompenso clinico, progressione dell'epatocarcinoma).

Negli ultimi venti anni l'HCC è passato dall'essere una patologia a prognosi quasi universalmente infausta ad una neoplasia che può essere prevenuta e, quando diagnosticata in fase iniziale, trattata in maniera efficace.

OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo dello studio è stato quello di analizzare l'influenza dell'eziologia dell'epatopatia cronica sulle caratteristiche della cirrosi e dell'HCC alla diagnosi e sugli outcomes clinici (sopravvivenza, causa di morte) in una coorte di pazienti osservati consecutivamente dal 2000 al 2010 e seguiti prospetticamente presso l'Unità Operativa di Epatologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, centro di riferimento regionale per la Diagnosi e il Trattamento delle Epatopatia croniche e del Tumore del Fegato.

PAZIENTI E METODI

1. Pazienti

Abbiamo analizzato retrospettivamente 490 pazienti giunti all'osservazione presso l'U.O. di Epatologia dal 2000 al 2010. Sono stati inclusi nello studio tutti i pazienti nei quali la diagnosi di HCC è stata posta in base all'istologia o, in soggetti cirrotici, per la presenza di lesioni focali epatiche (singole o multiple) con pattern vascolare tipico all'imaging, in accordo con le correnti linee guida per la gestione dell'HCC definite dall'EASL (European Association for the Study of Liver) e dall'AASLD (American Association for the study of Liver Disease). La diagnosi di cirrosi è stata basata sull'istologia o sulla storia clinica (episodi di scompenso epatico quali ascite e/o encefalopatia), o sulla presenza di segni radiologici o endoscopici suggestivi di cirrosi.

Cinquantotto pazienti (11,8%) hanno sviluppato l'epatocarcinoma durante il follow-up della malattia epatica cronica (Chronic Liver Disease, CLD) presso l'U.O. Epatologia. Trecentootto (62,9%) pazienti sono afferiti all'UO dopo la diagnosi di epatocarcinoma e 109 (22,2%) avevano già ricevuto un trattamento per l'HCC prima della valutazione presso la nostra U.O. Complessivamente 366 pazienti sono stati seguiti presso la nostra unità per una media di $38,8 \pm 33,5$ mesi (fino ad aprile 2013). I restanti 124 pazienti (25,3%), hanno effettuato una sola visita di consulenza e poi sono stati seguiti e trattati in altri centri.

2. Metodi

Abbiamo creato un database, dove sono stati inseriti i dati dei pazienti studiati, ed in particolare:

1. Dati anagrafici: sesso, età al momento della diagnosi;
2. Peso e altezza, indice di massa corporea (Body Mass Index, BMI);
3. Fattori di rischio per malattia epatica cronica e carcinoma epatocellulare:
 - infezione da HBV: marcatori sierici di infezione (Hepatitis B surface Antigen, HBsAg: positivo o negativo) o di pregressa esposizione (anticorpi anti-Hepatitis B core antigen, anti-HBc: positivi o negativi);
 - infezione da HCV: marcatori di avvenuta esposizione/infezione da virus dell'epatite C (anticorpi anti-HCV e HCV-RNA);
 - infezione da HDV: marcatori di avvenuta esposizione/infezione da virus dell'epatite D (anticorpi anti-HDV e HDV-RNA);

- l'introduzione di alcol, classificata come assente, modesta (< 30 g/die per le donne e < 40 g/die per gli uomini), moderata (30-60 g/die per le donne e tra 40-80 g/die per gli uomini) ed elevata (rispettivamente > 60 e > 80 g/die);
- sovrappeso (BMI > 25 e ≤ 30 kg/m² o obesità (BMI > 30 kg/m²);
- dismetabolismo glucidico (insulinoreistenza, intolleranza al glucosio o diabete mellito);
- emocromatosi;
- cirrosi biliare primitiva;
- altro

4. Caratteristiche della sottostante malattia cronica di fegato:

- assente, presente senza e con cirrosi;
- l'attività biochimica: livelli di AST e ALT durante gli ultimi 6-12 mesi prima della diagnosi del tumore (costantemente al di sotto di 2,5 volte il valore normale, fluttuanti fra 2,5 e 5 volte oppure oltre 5 volte il valore normale);
- lo stadio della malattia epatica al momento della diagnosi: valutata in base alla funzione epatica definita secondo la classificazione Child-Pugh;
- la presenza o meno di ipertensione portale, definita dall'evidenza di segni ecografici [dilatazione della vena porta (> 12 mm all'ilo epatico) con riduzione della velocità di flusso, ridotta dinamica respiratoria della vena porta, splenica o mesenterica, o presenza di circoli collaterali associate a splenomegalia (DL > 12 cm)] o endoscopici (varici gastro-esofagee o gastropatia ipertensiva);
- eventuali episodi di scompenso clinico (ascite, encefalopatia o sanguinamento da varici esofagee) prima o al momento della diagnosi di HCC.

5. Diagnosi dell'epatocarcinoma:

- la data della diagnosi;
- la modalità di diagnosi: effettuata a seguito di un follow-up in un paziente a rischio, o occasionale in virtù di indagini effettuate per altri motivi;
- sintomi correlati alla presenza del tumore, come il sanguinamento della lesione stessa, il dolore addominale, la perdita di peso, lo scompenso clinico;
- il tipo di diagnosi: istologica mediante biopsia, o radiologica mediante il riscontro di lesione/i con comportamento vascolare tipico all'imaging.

6. Caratteristiche dell'HCC:

- tipo di lesione: unica, multifocale fino a 3 noduli, multifocale >3 noduli, massiva-diffusa;
- diametro della lesione singola o della maggiore;
- estensione del tumore < o > al 50 % del volume epatico;
- invasione vascolare definita dalla presenza di trombosi della vena porta o dei suoi rami principali;
- stadio della neoplasia definito sulla base della classificazione del BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer);
- livelli di AFP (valore numerico e classificato in 4 categorie: valori ≤ 20 ng/ml, compresi tra 21 e 100 ng/ml o tra 101 e 400 ng/ml e >400 ng/ml).

7. Trattamento dell'epatocarcinoma:

- eventuale trattamento per HCC (sì/no);
- tipo di primo trattamento svolto: trapianto (Orthotopic liver transplantation, OLT), resezione epatica, iniezione percutanea di alcol (percutaneous ethanol injection, PEI), ablazione termica percutanea (radiofrequency thermo-ablation, RFTA), chemioembolizzazione transarteriosa (trans-arterial chemo-embolization, TACE), trattamenti combinati (ad esempio RFTA+TACE, RFTA+PEI), trattamento farmacologico (con sorafenib o megestrol), o altro (ad esempio termoablazione con HIFU, high intensity focused ultrasound).

8. Sopravvivenza

- stato del paziente: vivente, morto o perso al follow up;
- data della morte o dell'ultima visita effettuata;
- causa della morte: progressione del tumore, progressione della cirrosi sottostante, o non correlata alla malattia epatica;
- sopravvivenza espressa in mesi di vita dalla data della diagnosi alla morte o all'ultima visita.

3. Analisi statistica

I dati numerici sono stati espressi come media \pm deviazione standard (SD) e confrontati attraverso l'analisi della varianza (ANOVA). I dati categorici sono stati presentati come conteggi e percentuali e valutati con il test del Chi-quadro. La sopravvivenza del paziente è stata calcolata utilizzando il metodo di Kaplan-Meier. L'analisi univariata dei fattori

influenzanti la sopravvivenza è stata eseguita con il log-rank test e l'analisi multivariata con il modello di regressione di Cox. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0.05$. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software SPSS versione 20.0.

RISULTATI

1. Caratteristiche al basale della coorte

Nella coorte di 490 pazienti l'età media alla diagnosi di HCC è stata di 68 (± 9.0) anni, con un range compreso tra 34 e 91 anni; 355 (72,4%) pazienti erano di sesso maschile e 135 (27,6%) di sesso femminile (Tabella 2).

Un'epatopatia cronica era presente nella quasi totalità (99,2%) della coorte e il 96,3% dei pazienti era cirrotico. L'eziologia della CLD era l'infezione da HCV in 314 pazienti (64,1%), l'infezione da HBV in 66 (13,5%), la coinfezione di entrambi i virus in 7 (1,4%), una causa non virale, legata all'alcol e/o a patologie dismetaboliche, in 103 pazienti (21%). La prevalenza di infezione occulta da HBV, evidenziata dalla positività per anticorpi anti-HBc in soggetti HBsAg negativi è stata valutata in 294 dei 417 pazienti HBsAg negativi: sono risultati anti-HBc positivi 23 (32,4%) dei 71 pazienti anti-HCV negativi e 95 (42,6%) dei 223 pazienti anti-HCV positivi.

Tabella 2. Caratteristiche dei pazienti e dell'epatopatia cronica al momento della diagnosi di HCC

		Media (\pmDS) o n. (%)	
		Coorte completa 490 pazienti	Coorte per analisi outcomes clinici 228 pazienti
Età (anni)		68,0 (\pm 9,0)	67,2 (\pm 8,8)
Sesso:	Maschi	355 (72,4%)	171 (75,0%)
	Femmine	135 (27,6%)	57 (25,0%)
Malattia cronica di fegato:			
Assente		4 (0,8%)	1 (0,4%)
Presente, no cirrosi		14 (2,9%)	6 (2,6%)
Presente, cirrosi		472 (96,3%)	221 (96,9%)
Eziologia:	HBV (\pm HDV)	66 (13,5%)	30 (13,2%)
	HCV	314 (64,1%)	149 (65,4%)
	Coinfezione HBV /HCV	7 (1,4%)	1 (0,4%)
	Non virale	103 (21,1%) ⁽¹⁾	48 (21,1%)
BMI:	$\leq 25 \text{ kg/m}^2$	173 (35,3%)	111 (48,7%)
	$>25 - \leq 30 \text{ kg/m}^2$	114 (23,3%)	85 (37,3%)
	$>30 \text{ kg/m}^2$	42 (8,5%)	32 (14,0%)
	Non noto	161 (32,9%)	
Dismetabolismo glucidico ⁽²⁾		197 (40,2%)	87 (38,2%)
Alcohol intake (moderate-high)		129 (26,3%)	69 (30,3%)
Attività biochimica:			
Livelli di ALT (x v.n. ⁽³⁾)	<2.5	268 (54,7%)	145 (63,6%)
	$\geq 2.5 \text{ e } \leq 5$	101 (20,6%)	71 (31,1%)
	>5	15 (3,1%)	12 (5,3%)
	Non noto	106 (21,6%)	
Funzione epatica: Child-Pugh	A	338 (69,0%)	187 (82,0%)
	B	84 (17,1%)	36 (15,8%)
	C	26 (5,3%)	5 (2,2%)
	Non noto	42 (8,6%)	
Ipertensione portale (presente)		287 (58,6%)	129 (56,6%)
Episodi di scompenso epatico		116 (23,7%)	37 (16,2%)

⁽¹⁾ Alcol 5,1%, dismetabolica 3,9%; Alcol/dismetabolica 7,8%; Criptogenetica 4,3%

⁽²⁾ Presenza di diabete mellito, intolleranza al glucosio o insulino-resistenza

⁽³⁾ x v.n. = numero di volte sopra il limite superiore della norma

Il BMI era disponibile in 329 pazienti: il 34,7% risultava in sovrappeso e il 12,7% francamente obeso. Il dismetabolismo glucidico era presente in 197 pazienti (40,2%) e un consumo di alcol moderato o elevato in 129 (26,3%).

L'attività biochimica della malattia epatica nei 6-12 mesi prima della diagnosi di HCC era lieve in 268 pazienti (54,7%), moderata in 101 (20,6%) ed elevata in 15 (3,1%) pazienti; non valutabile in 106 pazienti (il 21,6% della casistica).

Per quanto concerne la funzionalità epatica alla diagnosi di HCC, valutata secondo la classificazione di Child-Pugh, 338 pazienti (69%) erano in classe A, 84 (17,1%) in classe B e 26 (5,3%) in classe C, mentre il dato non era disponibile in 42 (8,6%) dei pazienti.

287 pazienti (58,6%) avevano segni ecografici o endoscopici di ipertensione portale e 116 (23,7%) ha avuto episodi di scompenso clinico prima o al momento della diagnosi.

In 239 pazienti (58,6%) il carcinoma epatocellulare è stato diagnosticato durante lo screening per l'epatopatia cronica nota; la diagnosi è stata invece occasionale in 117 pazienti (28,7%) e in seguito alla comparsa di sintomi in 52 (12,7%) (Tabella 3). La diagnosi di epatocarcinoma è stata posta sulla base di un esame istologico in 45 pazienti (9,2%); in tutti gli altri casi la diagnosi è stata radiologica per la presenza di un pattern vascolare tipico all'imaging.

Alla diagnosi l'HCC era risultato monofocale nel 57,7% dei casi, multifocale fino a 3 noduli nel 23,1%, multifocale >3 noduli nell'8,8% e diffusa/massiva nel 10,4% dei pazienti; nel 3,5% dei casi era già presente un'invasione vascolare.

Secondo la classificazione BCLC, l'HCC alla diagnosi era in stadio 0 in 47 pazienti (9,6%), stadio A1 in 172 (35,2%), A2 in 21 (4,3%), A3 in 10 (2%), A4 in 66 (13,5%), B in 132 (27%), C in 15 (3,1%) e D in 26 (5,3%).

I livelli di AFP disponibili in 365 pazienti erano: ≤ 20 ng/ml in 173 (35,3%), ≤ 100 ng/ml in 93 (19%), ≤ 400 ng/ml in 50 (10,2%), > 400 ng/ml nei restanti 49 (10,0%).

Tabella 3. Caratteristiche dell'epatocarcinoma alla diagnosi

		Media (\pm DS) o n. (%)	
		Coorte completa 490 pazienti	Coorte per analisi outcomes clinici 228 pazienti
Causa di diagnosi:	Screening	239 (48,8%)	148 (64,9%)
	Sintomi	52 (10,6%)	23 (10,1%)
	Occasionale	117 (23,9%)	57 (25,0%)
	Non nota	82 (16,7%)	
Stadio HCC:	Unifocale	281 (57,3%)	158 (69,3%)
	Multifocale 2-3 noduli	113 (23,1%)	45 (19,7%)
	Multifocale >3 noduli	43 (8,8%)	17 (7,5%)
	Massivo-diffuso	52 (10,6%)	8 (3,5%)
	Non noto	1 (0,2%)	
Diametro massimo HCC (mm)		36 (± 23)	34 (± 19)
Invasione vascolare neoplastica		17 (3,5%)	3 (1,3%)
Livelli alfa-fetoproteina (ng/mL):			
	≤ 20	173 (35,3%)	120 (52,6%)
	$> 20 - \leq 100$	93 (19,0%)	62 (27,2%)
	$> 100 - \leq 400$	50 (10,2%)	28 (12,3%)
	> 400	49 (10,0%)	18 (7,9%)
	Non noto	125 (25,5%)	

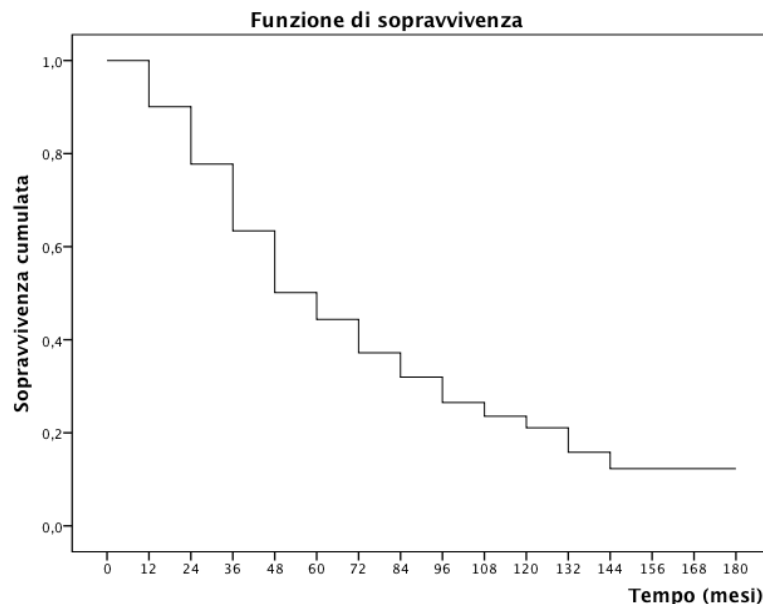
E' stata osservata una correlazione significativa tra dimensioni dell'HCC alla diagnosi e modalità di diagnosi: diametro medio della lesione di 29 mm nei pazienti con diagnosi in

corso di screening e rispettivamente di 45 e 53 mm nei pazienti con diagnosi occasionale o a causa dei sintomi ($p<0,001$). Similmente lo stadio del tumore alla diagnosi risultava all'interno dei criteri di Milano rispettivamente nel 76,2%, 60,7% e 38,5% dei casi nei tre sottogruppi ($p<0,001$).

Complessivamente 279 dei 366 (76,2%) pazienti seguiti presso l'UO Epatologia hanno ricevuto un trattamento per l'HCC; il tasso di trattamento è stato dell'83% nei pazienti con diagnosi di HCC durante lo screening, nel 74,7% in quelli in cui la diagnosi era occasionale e nel 44,4% di quelli che presentavano già sintomi. Il primo trattamento è stato la chemioembolizzazione transarteriosa (TACE) nel 40,9% dei casi, l'alcolizzazione (PEI) nel 17,2%, la termoablazione con radiofrequenza (RFTA) nel 16,8% dei casi, la resezione epatica nel 8,6%, la terapia farmacologica nel 7,3%, un trattamento combinato nel 5,7% e il trapianto nel 4,3% dei casi; due pazienti sono stati trattati con termoablazione mediante HIFU (High Intensity Focused Ultrasound) e un paziente con ipertermia.

La sopravvivenza media dei 366 pazienti seguiti presso il nostro centro dopo il primo consulto è stata di $42,2 \pm 33,8$ (1-238) mesi (Fig. 16). La progressione dell'HCC è stata la causa di morte nel 65,8% dei casi, la progressione della cirrosi nel 23,6%, e una patologia extraepatica nel 10,6%.

Figura 16. Funzione di sopravvivenza nella coorte completa.



2. Influenza dell'eziologia sulle caratteristiche basali e sugli esiti clinici

Abbiamo quindi analizzato la correlazione tra caratteristiche cliniche alla diagnosi ed eziologia dell'epatopatia: da HBV, da HCV e non virale (Tabella 4), con esclusione dei pazienti con coinfezione HBV/HCV per l'esiguità del campione (7 pazienti).

I pazienti HBsAg positivi avevano un'età significativamente più giovane (63,9 anni; $p<0,001$) e una più alta prevalenza di sesso maschile (93,9%; $p<0,001$) rispetto ai pazienti anti-HCV+ o con epatopatia non virale (Tabella 4); l'epatocarcinoma alla diagnosi era meno frequentemente all'interno dei criteri di Milano (60% dei casi, $p=0,017$).

I pazienti anti-HCV positivi erano più anziani (69,4 anni) e avevano una diagnosi di HCC più frequentemente in corso di screening (67,6%); l'HCC era più frequentemente entro i criteri di Milano (75%) con un diametro massimo inferiore rispetto ai soggetti HBsAg+ e HBsAg/anti-HCV negativi (34,1 vs 42,2 vs 39,9 mm; $p=0,020$).

I pazienti HBsAg/anti-HCV negativi (non virali) avevano livelli di ALT significativamente più bassi ($p<0,001$) e una funzionalità epatica più compromessa rispetto ai pazienti HBsAg+ e anti-HCV+ (Child-Pugh A solo nel 68% dei casi vs 81,8% e 79,9%; $p=0,028$) con una maggior frequenza di episodi di scompenso clinico (35,9% vs 16,7% vs 21,0%; $p=0,003$). La diagnosi è avvenuta in corso di screening in un terzo dei casi (33,7% vs 54,1% vs 67,6%; $p<0,001$); l'HCC rientrava nei criteri di Milano meno frequentemente (61,9%) rispetto ai pazienti anti-HCV+ (75%).

Tabella 4. Confronto delle caratteristiche cliniche alla diagnosi in base all'eziologia dell'epatopatia.

	HBsAg+ (66 paz.)	Anti-HCV+ (314 paz.)	HBsAg / anti-HCV- (103 paz.)	Popolazione complessiva (483 paz.)	Significatività <i>p</i>
Età (anni)	63,9	69,4	66,3	68,0	<0,001
Sesso (maschi)	93,9%	65,3%	81,6%	72,7%	<0,001
CLD:					
Assente	0,0%	0,0%	3,9%	0,8%	0,001
Presente senza cirrosi	6,1%	2,5%	1,0%	2,7%	
Cirrosi	93,9%	97,5%	95,1%	96,5%	
Attività biochimica:					
ALT ⁽¹⁾ <2.5	57,6%	52,9%	59,2%	54,9%	<0,001
≥2.5 e ≤5	19,7%	26,8%	2,9%	20,7%	
>5	7,6%	3,2%	0,0%	3,1%	
Non noto	15,2%	17,2%)	37,9%	21,3%	
Funzione epatica (Child-Pugh A)	81,8%	79,9%	68,0%	77,6%	0,028
Ipertensione portale (presente)	56,1%	58,6%	61,2%	58,8%	0,800
Episodi di Scompenso	16,7%	21,0%	35,9%	23,6%	0,003
Diagnosi di HCC in corso di screening	54,1%	67,6%	33,7%	58,3%	<0,001
Stadio di HCC: entro i criteri di Milano	60,0%	75,0%	61,9%	70,4%	0,017
Diametro massimo HCC (mm)	42,2	34,1	39,9	36,3	0,020
Invasione vascolare	6,1%	3,2%	2,9%	3,5%	0,479
Alfa-fetoproteina (ng/mL):					
≤20	30,3%	33,1%	45,6%	35,4%	0,062
>20-≤100	16,7%	21,7%	11,7%	18,6%	
>100-≤400	6,1%	10,8%	12,6%	10,6%	
>400	12,1%	10,5%	5,8%	9,7%	
Non noto	34,8%	23,9%	24,3%	25,5%	

⁽¹⁾ numero di volte sopra il limite superiore della norma

In 227 pazienti per i quali erano disponibili tutti i dati basali, compreso lo status dell'anti-HBc, (Tabelle 2 e 3; è stato escluso l'unico paziente con infezione HBV/HCV) e di eventi, è stata analizzata l'influenza dell'eziologia (compresa la presenza di infezione occulta da HBV) sulle caratteristiche di presentazione e sugli esiti clinici (sopravvivenza, causa di morte) (Tabella 5). *Tra i soggetti anti-HCV positivi*, i pazienti anti-HBc+ avevano una attività biochimica di malattia minore rispetto ai soggetti anti-HBc- (ALT ≥2.5x nel 32,8% vs il 55.5% dei casi) e tendevano ad avere una epatopatia meno avanzata (prevalenza di ipertensione portale 47,7% vs 58,3%; episodi di scompenso nel 6,2% vs 17,9% dei casi) nonostante un livello di funzionalità epatica secondo Child-Pugh

paragonabile (Child-Pugh A in 84,6% vs 81,0%). I pazienti anti-HBc- hanno presentato un tasso di mortalità per HCC lievemente inferiore (58,1% vs 66,7%), ma una maggiore mortalità per patologia extraepatica (11,6% vs 2,6%). *Tra i soggetti HBsAg/anti-HBc/HCV negativi*, i pazienti con infezione occulta da HBV presentavano più elevati livelli di transaminasi (ALT $\geq 2.5x$ nel 15,4% vs lo 0% dei soggetti anti-HBc-) e un'epatopatia più avanzata (ipertensione portale presente nell'84,6% vs il 60,0% dei casi e episodi di scompenso nel 38,5% vs il 28,6%) a parità di funzionalità epatica secondo Child-Pugh. La diagnosi di HCC era avvenuta più frequentemente in corso di screening nei soggetti anti-HBc+ (72,7% vs 28,1%) con diametro dell'HCC inferiore (30 vs 36 mm), ma con un minor tasso di trattamento dell'HCC (69,2% vs 85,7%). Infine la morte era sopravvenuta più frequentemente per progressione dell'HCC nei pazienti anti-HBc+ (72,7% vs 46,2%), mentre il 46,2% dei pazienti anti-HBc negativo morì per cause extraepatiche. Complessivamente il tasso di mortalità per progressione dell'epatocarcinoma ha mostrato un andamento decrescente dai pazienti HBsAg+ (87,5%) ai non virali/anti-HBc+ (72,7%), anti-HCV+/anti-HBc+ (66,7%), anti-HCV+/anti-HBc- (58,1%) e non virali/anti-HBc- (46,2%) ($p=0,001$). Il più basso tasso di mortalità per progressione della cirrosi nei pazienti HBsAg+ (<5%) rispetto ai soggetti anti-HCV+ (30%), nonostante uno stadio di funzionalità epatica al basale sovrapponibile, è verosimilmente dovuto al rallentamento della progressione dell'epatopatia indotto dal trattamento con antivirali messo in atto in tutti i pazienti con epatite cronica B.

Tabella 5. Caratteristiche alla diagnosi e outcomes clinici: influenza dell'eziologia dell'epatopatia e dell'infezione occulta da HBV

	HBsAg+ (30 paz.)	Anti-HCV+ Anti-HBc+ (65 paz.)	Anti-HCV+ Anti-HBc- (84 paz.)	HBsAg / anti-HCV- Anti-HBc+ (13 paz.)	HBsAg / anti-HCV- Anti-HBc- (35 paz.)	Popolazione complessiva (227 paz.)	Significatività <i>p</i>
Età (anni)	62,2	69,0	68,4	66,3	65,6	67,2	0,004
Sesso (maschi)	93,3%	67,7%	66,7%	92,3%	85,7%	74,9%	0,006
CLD: Assente	0,0%	0,0%	0,0%	0%	2,9%	1,0%	0,589
Presente (NO cirrosi)	3,3%	1,5%	3,6%	0%	2,9%	2,6%	
Cirrosi	96,7%	98,5%	96,4%	100%	94,2%	96,9%	
Attività biochimica ALT ≥ 2.5 ⁽¹⁾	37,0%	32,8%	55,0%	15,4%	0,0%	36,6%	<0,001
Funzione epatica Child-Pugh A	90,0%	84,6%	81,0%	76,9%	74,3%	81,9%	0,510
Ipertensione portale: presente	56,7%	47,7%	58,3%	84,6%	60,0%	56,8%	0,163
Episodi di Scompenso	10,0%	6,2%	17,9%	38,5%	28,6%	16,3%	0,006
Diagnosi di HCC allo screening	63,3%	74,1%	73,3%	72,7%	28,1%	64,9%	<0,001
Stadio di HCC: entro i criteri di Milano	66,7%	73,8%	79,8%	69,2%	65,7%	73,6%	0,458
Diametro massimo HCC (mm)	38,5	33,9	31,7	29,8	36,5	33,8	0,392
Invasione vascolare	3,3%	1,5%	1,2%	0,0%	0,0%	1,3%	0,807
AFP >400	16,7%	7,7%	7,1%	7,7%	2,9%	7,9%	0,349
Trattamento di HCC (si)	90,0%	78,5%	86,9%	69,2%	85,7%	83,7%	0,296
Sopravvivenza (mesi)	52,6	39,1	40,7	42,1	39,1	41,7	0,257
Causa di morte: HCC	87,5%	66,7%	58,1%	72,7%	46,2%	64,8%	0,001
Cirrosi	0,0%	30,8%	30,2%	27,3%	7,7%	23,8%	
Extra-epatica	12,5%	2,6%	11,6%	0,0%	46,2%	11,5%	

⁽¹⁾ numero di volte sopra il limite superiore della norma

Complessivamente i dati dimostrano come l'eziologia dell'epatopatia sottostante influenza l'epidemiologia dell'HCC, il decorso clinico e le cause di morte.

3. Analisi dei fattori che influenzano la sopravvivenza

La valutazione è stata effettuata sulla sottocorte di 228 pazienti per i quali erano disponibili tutti i dati basali e di outcome (Tabella 2 e 3). All'analisi univariata i fattori associati ad una più lunga sopravvivenza sono stati: l'età inferiore ai 75 anni ($p=0,001$), l'assenza di infezione occulta da HBV [rispetto alla presenza di un'infezione manifesta da HBV (HBsAg+) e all'assenza di marcatori di HBV; $p=0,039$], l'assente o lieve assunzione di alcol ($p=0,037$), l'attività biochimica lieve ($p=0,008$), la funzione epatica conservata (Child-Pugh classe A, $p<0,001$), l'assenza di segni di ipertensione portale ($p=0,001$), l'assenza di episodi di scompenso epatico ($p<0,001$), la presenza di una lesione monofocale $\leq 2\text{cm}$ (vs altre lesioni entro i criteri di Milano vs altre lesioni oltre i criteri di Milano vs HCC Massivo-diffuso, $p<0,001$), l'assenza di invasione vascolare ($p<0,001$), i livelli di AFP $<20\text{ ng/mL}$ ($p=0,001$), l'assenza di sintomi alla diagnosi ($p=0,001$) e l'aver ricevuto un trattamento per l'epatocarcinoma (vs nessun trattamento, $p<0,001$). Il sesso, l'eziologia (HBV vs HCV vs non virale), la presenza di infezione da HCV, o da HBV, il sovrappeso/obesità ($p=0,067$) e il dismetabolismo glucidico, non sono risultati associati in modo significativo alla sopravvivenza (Tabella 6).

Tabella 6. Fattori che influenzano la sopravvivenza: Analisi univariata

Fattori	Categorie di riferimento	Significatività <i>p</i>
Età	>75 anni	0,001
Sovrappeso/obesità (BMI>25)	Presente	0,067
Infezione occulta da HBV (HBsAg-/anti-HBc+)	Anti-HBc+ ⁽¹⁾	0,039
Introduzione alcolica	Moderata-elevata	0,037
Attività biochimica	ALT >5x v.n. ⁽²⁾	0,008
Funzione epatica (Classe di Child-Pugh)	A ⁽³⁾	<0,001
Ipertensione portale	Presente	0,001
Episodi di scompenso epatico	Presenti	<0,001
Sintomi alla diagnosi	Presenti	<0,001
Stadio di HCC	Unifocale ≤2 cm	<0,001
Invasione vascolare	Presente	<0,001
AFP	>20 ng/mL ⁽⁵⁾	0,001
Trattamento di HCC	No	<0,001

⁽¹⁾ vs HBsAg+ and HBsAg-/anti-HBc-

⁽²⁾ vs ALT ≤5x v.n.

⁽³⁾ vs B vs C

⁽⁴⁾ vs altri all'interno dei criteri di Milano (MC) vs altri fuori dai criteri di Milano (oMC) vs massivo-diffuso (M-D)

⁽⁵⁾ vs ≤20 ng/mL

(*) Le variabili che non hanno significativamente influenzato la sopravvivenza ($p>0,10$) all'analisi univariata sono state: sesso ($p=0,241$), eziologia della malattia epatica cronica (HBV vs HCV vs Non virali ; $p=0,407$), infezione da HBV (HBsAg +; $p=0,346$), infezione da HCV ($p=0,613$), dismetabolismo glucidico ($p=0,306$).

All'analisi multivariata, sono risultati fattori indipendentemente associati alla sopravvivenza: l'infezione occulta da HBV ($p=0,039$), la funzionalità epatica (secondo Child-Pugh; $p=0,002$), lo stadio del tumore ($p=0,001$), l'invasione vascolare ($p<0,001$), i livelli di AFP ($p=0,011$), e il trattamento ($p=0,007$); una significatività borderline è stata osservata per l'ipertensione portale ($p=0,052$), i sintomi alla diagnosi ($p=0,056$) e l'attività biochimica ($p=0,057$) (Tabella 7).

Tabella 7. Fattori che hanno influenzato la sopravvivenza: analisi multivariata

Fattori	Categorie di riferimento	Analisi multivariata		
		O.R.	95% C.I.	P
Infezione occulta da HBV (HBsAg-/anti-HBc+)	Anti-HBc+ ⁽¹⁾	1,479	1,020-2,143	0,039
Attività biochimica	ALT \leq 5x v.n. ⁽²⁾	2,180	0,978-4,861	0,057
Funzione epatica (Child-Pugh Class)	A B C	1,347 8,380	0,770-2,251 2,569-27,337	0,002
Ipertensione portale	Presente	1,491	0,997-2,230	0,052
Sintomi alla diagnosi	Presente	1,919	0,983-3,745	0,056
Stadio di HCC	Unifocale \leq 2cm ⁽³⁾ MC oMC M-D	1,289 1,722 6,584	0,801-2,072 0,999-2,969 2,613-16,591	0,001
Invasione vascolare	Presente	45,564	8,066-257,402	<0,00
AFP	>20 ng/mL ⁽⁴⁾	1,622	1,117-2,355	0,011
Trattamento di HCC	No	2,028	1,215-3,387	0,007

⁽¹⁾ vs HBsAg+ and HBsAg-/anti-HBc-

⁽²⁾ vs ALT \leq 5 times u.n.l.

⁽³⁾ vs B vs C

⁽⁴⁾ vs altri all'interno dei criteri di Milano (MC) vs altri fuori dai criteri di Milano (oMC) vs massivo-diffuso (M-D)

⁽⁵⁾ vs \leq 20 ng/mL

4. Nuovo score prognostico

L'elaborazione di un nuovo sistema di classificazione prognostica ha utilizzato 5 dei 6 (escluso il trattamento dell'HCC) parametri che si sono dimostrati in grado di influenzare significativamente la sopravvivenza. Inoltre è stato utilizzato il dato dell'ipertensione portale, che ha avuto un valore vicino alla significatività ($p=0,052$).

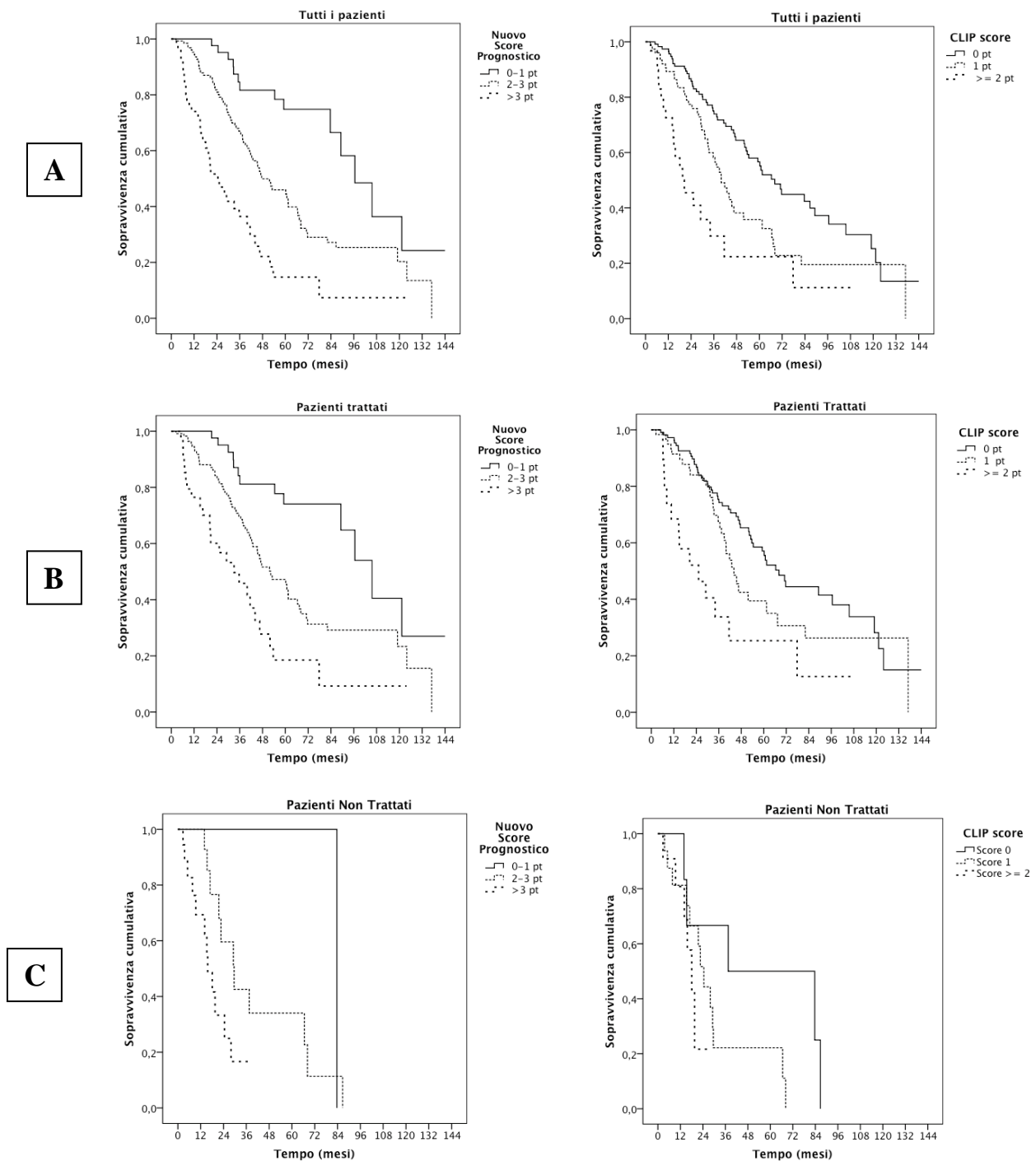
Abbiamo assegnato un punteggio arbitrario ad ogni parametro, tenendo conto del livello di significatività, come riportato nella Tabella 8.

Tabella 8. Proposta di un nuovo score prognostico e confronto con il CLIP

Nuovo score prognostico		CLIP score	
Parametri	Score	Parametri	Score
Isolato anti-HBc+ HBsAg+ o HBsAg-/anti-HBc- HBsAg-/anti-HBc+	0 1		
Funzione epatica Classe di Child-Pugh A B C	0 1 2	Funzione epatica Classe di Child-Pugh A B C	0 1 2
Ipertensione portale Assente Presente	0 1		
Stadio di HCC Unifocale ≤ 2 cm Altro entro i criteri di Milano Altro oltre i criteri di Milano Massivo-diffuso	0 1 2 3	Morfologia del tumore Uninodulare ed estensione $\leq 50\%$ del fegato Multinodulare ed estensione $\leq 50\%$ del fegato Massivo or estensione $> 50\%$ del fegato	0 1 2
Invasione vascolare neoplastica Assente Presente	0 2	Invasione vascolare neoplastica Assente Presente	0 1
Livelli AFP ≤ 20 ng/mL > 20 ng/mL	0 1	Livelli AFP ≤ 400 ng/mL > 400 ng/mL	0 1

Nell'applicazione dello score alla nostra casistica abbiamo analizzato infine l'intera coorte, quindi, dal momento che il trattamento dell'HCC (parametro escluso dallo score) risultava all'analisi multivariata influenzare significativamente la sopravvivenza, abbiamo valutato separatamente i pazienti trattati e non trattati. Abbiamo valutato le sopravvivenze associate ai singoli punteggi e, raggruppandole per similitudine, abbiamo quindi individuato 3 classi di punteggio (0-1, 2-3 e > 3 punti), che ben discriminano 3 gruppi di pazienti con differenti curve di sopravvivenza (Fig. 17). Nella nostra coorte il nostro nuovo score ha mostrato una performance migliore di quella osservata applicando lo score prognostico proposto nel 1998 dal CLIP (Fig. 17)

Figura 17. Sopravvivenza valutata con il nuovo score prognostico (Pisa score) e con il CLIP. A. Tutta la coorte di pazienti B. Pazienti trattati C. Pazienti non trattati



	Pisa score			CLIP score		
	Punteggio	Numero di pazienti	Sopravvivenza (mesi)	Punteggio	Numero di pazienti	Sopravvivenza (mesi)
Tutti i pazienti	0-1	44	58,9 ± 32,3	0	119	49,7 ± 31,8
	2-3	132	42,9 ± 30,9	1	77	38,1 ± 29,7
	>3	52	25,4 ± 22,4	>1	32	22,7 ± 22,7
Pazienti trattati	0-1	43	58,4 ± 32,5	0	110	51,0 ± 31,6
	2-3	114	45,1 ± 31,4	1	60	42,2 ± 30,9
	>3	34	31,1 ± 25,0	>1	21	27,1 ± 26,8
Pazienti non trattati	0-1	1	83,7 ± 0,00	0	9	34,1 ± 31,9
	2-3	18	28,9 ± 23,3	1	17	23,6 ± 19,3
	>3	18	14,6 ± 10,0	>1	11	14,4 ± 7,0

DISCUSSIONE

Lo studio di coorte conferma come nella nostra area geografica l'epatocarcinoma si sviluppi più frequentemente nei pazienti di sesso maschile e quasi esclusivamente in soggetti nei quali la sottostante malattia epatica cronica è progredita in cirrosi. In accordo con l'epidemiologia delle epatopatie croniche in Italia, la maggior parte dei pazienti (79%) presentava un'epatite cronica virale, prevalentemente HCV correlata. Tuttavia anche nella nostra coorte è significativa (21%) la popolazione di pazienti con epatopatia non virale: tale dato, in linea con quanto osservato in recenti studi multicentrici italiani^{253, 254}, dimostra come il divenire dell'epidemiologia delle malattie croniche di fegato abbia ripercussioni significative anche su quella dell'epatocarcinoma.

L'età più giovane al momento della diagnosi di HCC nei pazienti HBsAg positivi indica come, in stadi comparabili dell'epatopatia, l'HCC si sviluppi prima nei pazienti con infezione da HBV rispetto ai pazienti con infezione da HCV (età media 63,9 vs 69,4 anni). Questo dato è in accordo con l'evidenza che HBV ha un potenziale oncogenetico maggiore rispetto a HCV, in particolare nei maschi. E' noto infatti come l'HBV svolga un ruolo oncogenetico diretto, che si esplica attraverso meccanismi di integrazione del genoma virale in quello dell'epatocita, con conseguente alterazione dell'espressione di geni cellulari coinvolti nella regolazione della proliferazione e della differenziazione cellulare oppure attraverso la transattivazione di geni cellulari da parte di proteine virali (codificate da sequenze tronche della regione Pre-S/S e dal gene X). L'azione oncogenetica diretta inizia precocemente, in quanto l'integrazione dell'HBV-DNA nella cellula ospite è un evento che si verifica precocemente dopo l'infezione; tuttavia, almeno nei paesi occidentali, il rischio di HCC diventa significativo quasi esclusivamente nei soggetti con epatite cronica che hanno già sviluppato cirrosi, suggerendo la rilevanza dell'effetto di promozione neoplastica indotto dalla necro-infiammazione. Per l'HCV l'attività oncogenetica diretta è molto meno sicura e le evidenze in vitro che la dimostrerebbero sono inficiate da un'espressione antigenica virale enormemente più elevata di quelle riscontrabili in vitro e quindi i modelli sperimentali non sono convincenti. Non esiste, inoltre, un'evidenza di modello animale in cui l'infezione virale causi inequivocabilmente l'epatocarcinoma, a differenza di quanto risulta evidente per l'HepDNA virus che infetta la marmotta americana (Woodchuck Hepatitis Virus, WHV). Perciò nell'epatite cronica C e

nella cirrosi ad essa associata il ruolo di HCV nell'epatocarcinogenesi è essenzialmente promozionale, attraverso l'induzione di infiammazione cronica e rigenerazione epatica in presenza di cirrosi. In questi pazienti lo sviluppo di cirrosi avviene generalmente ad una età più avanzata rispetto ai pazienti con epatite B^{255, 256}, anche in relazione alle differenti modalità ed età di acquisizione dell'infezione (spesso nei primi anni di vita per HBV, per via parenterale più frequentemente dopo la seconda-terza decade di vita per HCV). In corso di epatopatia cronica, la velocità di progressione del danno epatico è influenzata anche da cofattori (metabolico, tossico) e spesso l'andamento non è lineare: ad esempio nella donna la malattia da HCV dimostra una progressione lenta nel periodo fertile, con riduzione dell'attività biochimica durante la gravidanza, ma acquista spesso una più rapida evolutività dopo la menopausa, con incremento del tasso di progressione a cirrosi ed HCC²⁵⁷. In accordo con queste evidenze il nostro studio ha dimostrato che nei pazienti con infezione da HCV, l'epatocarcinoma insorge in età più avanzata e più frequentemente nelle donne, non solo rispetto ai pazienti HBsAg positivi, ma anche rispetto ai pazienti HBsAg/anti-HCV negativi (34,7% vs 6,1% vs 19,4%). Nei pazienti anti-HCV positivi la diagnosi è stata posta più frequentemente in corso di screening (67,6% vs 54,1% vs 33,7%) e l'HCC alla diagnosi presentava uno stadio più precoce, risultando entro i criteri di Milano nel 75% dei casi (vs 60% e 61,9%) e con diametro della lesione maggiore più piccolo (34 mm vs 42 e 40 mm). Ciò dimostra come nella gestione dei pazienti con epatopatia cronica da HCV siano in atto protocolli di monitoraggio, che adeguatamente valutano il rischio neoplastico. Le implicazioni cliniche dell'attiva sorveglianza sono rilevanti come dimostrato dal fatto che i pazienti con diagnosi posta in corso di screening presentavano uno stadio della neoplasia più precoce indipendentemente dell'eziologia. L'evidenza che solo un terzo dei pazienti con epatopatia non virale abbia avuto diagnosi in corso di sorveglianza ecografica, con conseguente riscontro di neoplasia in fase più avanzata e conseguente minor spazio terapeutico, suggerisce una sottostima del rischio neoplastico in questo gruppo di epatopatici.

L'analisi condotta sulla sottopopolazione di 228 pazienti per i quali erano disponibili sia i dati relativi all'infezione occulta da HBV (anti-HBc+/anti-HBc-) che quelli sul decorso clinico, ha evidenziato come i pazienti anti-HCV positivi con pregressa esposizione ad HBV (anti-HBc+) avessero una attività biochimica inferiore e una malattia epatica meno avanzata (prevalenza di ipertensione portale 47,7% vs 58,3% ed episodi di scompenso nel

6,2% vs 17,9% dei casi) rispetto ai pazienti anti-HCV+/anti-HBc-. Questo dato ulteriormente ribadisce il ruolo oncogenetico svolto da HBV, anche se presente come infezione occulta. Come precedentemente accennato, l'integrazione del genoma virale in quello cellulare è un fenomeno precoce nel corso dell'infezione, che avviene anche quando questa risulta essere autolimitantesi. Inoltre, il persistere della matrice replicativa del virus (cccDNA) nel nucleo degli epatociti, anche in soggetti che hanno perso l'HBsAg, crea il presupposto biologico per il realizzarsi di ulteriore integrazione virale nel corso della fisiologica rigenerazione epatocitaria. Pertanto i pazienti con infezione occulta da HBV mantengono un potenziale rischio di HCC legato all'azione "inducente" del virus e in presenza di altri fattori di danno epatico che causano cirrosi si determina la promozione del processo carcinogenetico con sviluppo del tumore. Tale processo ha caratteristiche diverse rispetto a quelle dei pazienti non esposti ad HBV, in quanto sembra richiedere un minore stimolo promozionale (attività necroinfiammatoria) e avviene più rapidamente, con insorgenza del tumore in uno stadio più precoce di cirrosi.

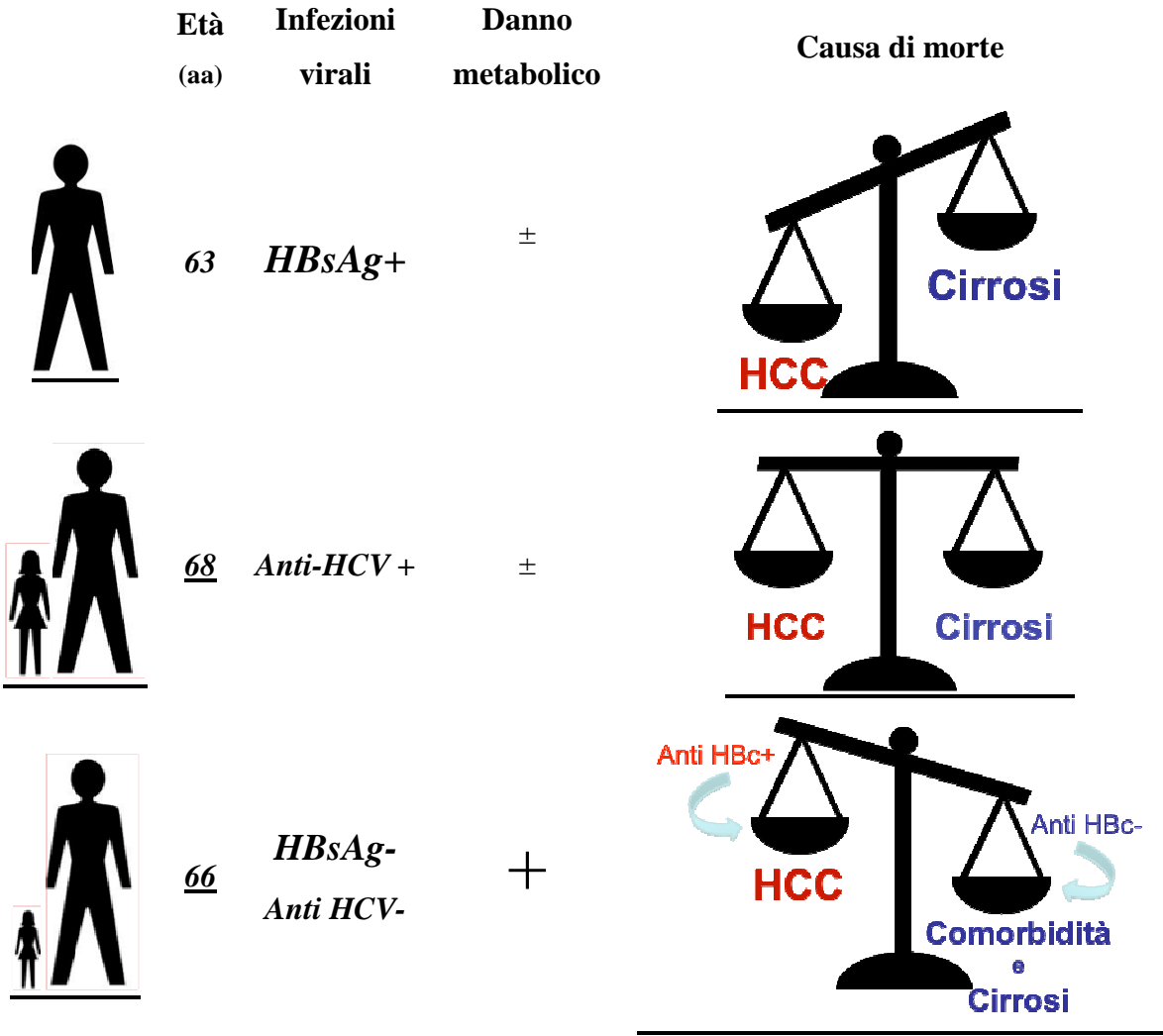
Nei pazienti della nostra coorte lo stato dell'infezione da HBV appare in grado di condizionare anche la causa di morte, infatti il tasso di mortalità dovuta alla progressione dell'HCC risulta essere massimo (87,5%) nei pazienti con infezione conclamata da HBV, HBsAg positivi, e ridursi, pur restando la prevalente causa di morte, nei pazienti con infezione occulta (decesso avvenuto per progressione dell'HCC nel 72,7% dei pazienti anti-HBc+ con epatopatia non virale e nel 66,7% dei pazienti anti-HCV/anti-HBc+ positivi). Il tasso di mortalità HCC correlato è risultato essere invece il più basso nel gruppo di pazienti senza avvenuta esposizione ad HBV (58,1% dei pazienti anti-HCV positivi/anti-HBc negativi e 46,2% in quelli HBsAg/anti-HCV/anti-HBc negativi). La disponibilità, per i pazienti HBsAg positivi, di trattamenti antivirali (analoghi nucleos(t)idici) in grado di spegnere la necroinfiammazione e significativamente rallentare la progressione della cirrosi ha sicuramente contribuito a ridurre la progressione della cirrosi e il suo scompenso. Tuttavia, l'evidenza di una più elevata mortalità per progressione dell'HCC anche tra i pazienti HBsAg negativi/anti-HBc positivi rispetto ai soggetti anti-HBc negativi sottolinea l'importanza del ruolo di HBV non solo nell'induzione del processo oncogenetico, ma anche nel condizionare una maggiore aggressività biologica dell'HCC.

Negli ultimi decenni sono state proposte molteplici classificazioni prognostiche: il sistema di punteggio CLIP utilizza come parametri la funzione epatica (punteggio di Child-Pugh) e le caratteristiche dell'HCC (numero e dimensioni delle lesioni, coinvolgimento vascolare e livelli di AFP). Nella classificazione BCLC, invece, sono stati inclusi anche il performance status, la presenza di ipertensione portale e la presenza di metastasi e sulla base della classificazione dei pazienti viene effettuata non solo una valutazione prognostica, ma vengono anche dati degli indirizzi terapeutici. Tuttavia, in nessuna classificazione ad oggi è stata inclusa l'eziologia dell'epatopatia o la valutazione dello stato dell'infezione da HBV. Sulla base delle evidenze emerse dallo studio e in particolare in considerazione del ruolo della presenza o meno di avvenuta esposizione ad HBV (anti-HBc+/anti-HBc-) abbiamo definito un nuovo score prognostico che comprende tutte le variabili indipendentemente associate alla sopravvivenza (escluso il trattamento) ed un ulteriore parametro relativo alla cirrosi, l'ipertensione portale, che all'analisi multivariata ha mostrato una significatività statistica molto vicina al valore soglia ($p=0,052$). Il nostro sistema di punteggio permette di discriminare 3 gruppi di pazienti con differenti curve di sopravvivenza, con una performance migliore rispetto a quella osservata applicando la classificazione secondo CLIP. La migliore capacità discriminante è evidente in particolare nei primi due anni di follow-up dopo la diagnosi, quando vi è una maggiore necessità di prendere decisioni per stabilire la strategia terapeutica.

CONCLUSIONI

Lo studio dimostra, per la prima volta, come l'eziologia dell'epatopatia e lo stato dell'infezione da HBV (HBsAg+; HBsAg-/anti-HBc+; HBsAg-/anti-HBc-) influenzino significativamente, assieme ai fattori già noti quali lo stadio della cirrosi e dell'HCC, la sopravvivenza e la causa di morte del paziente affetto da HCC. La caratterizzazione di specifici profili di presentazione e progressione della malattia neoplastica in funzione dell'eziologia potrà permettere di ottimizzare i programmi di sorveglianza e di definire strategie terapeutiche più personalizzate. I tre prototipi di pazienti affetti da HCC (soggetto HBsAg positivo, o anti-HCV positivo o HBsAg e anti-HCV negativo) (Fig. 18) presentano specificità che permettono di individuare possibilità di sostanziali miglioramenti nella diagnosi precoce o nella gestione terapeutica. L'evidenza che nel paziente HBsAg positivo la neoplasia (ad insorgenza precoce, 63 anni) costituisce la causa di morte principale, identifica questi pazienti come i migliori candidati per opzioni terapeutiche più aggressive e radicali. Nel paziente anti-HCV positivo, il rischio neoplastico è elevato anche nella donna, che dopo la menopausa spesso sviluppa una malattia epatica rapidamente evolutiva, e in circa il 30% dei casi è la cirrosi la causa di morte. Quindi, la strategia terapeutica dovrà essere scelta tenendo conto del rischio di progressione della sottostante epatopatia e della necessità di contenere l'impatto sulla massa epatica funzionante. I pazienti con epatopatia cronica non virale sono spesso soggetti con importanti co-morbidità quali diabete, obesità e cardiopatia, che sono causa del decesso nel 46% dei pazienti anti-HBc negativi. La concomitante presenza di tali patologie extraepatiche potrebbe, almeno in parte, giustificare la sottovalutazione del rischio neoplastico, infatti solo nel 34% dei casi la diagnosi di HCC è fatta nell'ambito di programmi di sorveglianza e al momento della diagnosi, sia l'HCC che la cirrosi sono in stadio avanzato.

Figura 18. Tre grandi modelli eziologici della sottostante CLD che condizionano sia il decorso clinico che la sopravvivenza nei pazienti con carcinoma epatocellulare.



Bibliografia

1. Fares N, Peron JM. [Epidemiology, natural history, and risk factors of hepatocellular carcinoma]. *Rev Prat.* 2013; 63(2): 216-7, 20-2.
2. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat.* 2004; 11(2): 97-107.
3. Bosetti C, Bianchi C, Negri E, Colombo M, La Vecchia C. Estimates of the incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in Italy in 2002 and projections for the years 2007 and 2012. *Tumori.* 2009; 95(1): 23-7.
4. AIRTRUM. I tumori del fegato. *Epidemiol Prev.* 2006; 30(supp. 2): 42-3.
5. Bolondi L, Cillo U, Colombo M, Craxi A, Farinati F, Giannini EG, et al. Position paper of the Italian Association for the Study of the Liver (AISF): The multidisciplinary clinical approach to hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis.* 2013; 45(9): 712-23.
6. Boone CW, Kelloff GJ, Steele VE. Natural history of intraepithelial neoplasia in humans with implications for cancer chemoprevention strategy. *Cancer research.* 1992; 52(7): 1651-9.
7. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer.* 1993; 72(3 Suppl): 962-70.
8. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends in genetics : TIG.* 1993; 9(4): 138-41.
9. Dragan YP, Pitot HC. The role of the stages of initiation and promotion in phenotypic diversity during hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis.* 1992; 13(5): 739-50.
10. Hanson KD, Shichiri M, Follansbee MR, Sedivy JM. Effects of c-myc expression on cell cycle progression. *Molecular and cellular biology.* 1994; 14(9): 5748-55.
11. Cote GJ, Lastra BA, Cook JR, Huang DP, Chiu JF. Oncogene expression in rat hepatomas and during hepatocarcinogenesis. *Cancer letters.* 1985; 26(2): 121-7.
12. Beer DG, Schwarz M, Sawada N, Pitot HC. Expression of H-ras and c-myc protooncogenes in isolated gamma-glutamyl transpeptidase-positive rat hepatocytes and in hepatocellular carcinomas induced by diethylnitrosamine. *Cancer research.* 1986; 46(5): 2435-41.
13. Fausto N. Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis. *Progress in growth factor research.* 1991; 3(3): 219-34.
14. Villa E, Dugani A, Moles A, Camellini L, Grottola A, Buttafoco P, et al. Variant liver estrogen receptor transcripts already occur at an early stage of chronic liver disease. *Hepatology.* 1998; 27(4): 983-8.
15. Webber EM, FitzGerald MJ, Brown PI, Bartlett MH, Fausto N. Transforming growth factor-alpha expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor-alpha and hepatocyte growth factor. *Hepatology.* 1993; 18(6): 1422-31.
16. Pitot HC, Sirica AE. The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta.* 1980; 605(2): 191-215.
17. Rabes HM. Development and growth of early preneoplastic lesions induced in the liver by chemical carcinogens. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 1983; 106(2): 85-92.
18. Sell S, Dunsford HA. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *The American journal of pathology.* 1989; 134(6): 1347-63.

19. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(9): 674-87.
20. Nagaya T, Nakamura T, Tokino T, Tsurimoto T, Imai M, Mayumi T, et al. The mode of hepatitis B virus DNA integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma. *Genes & development*. 1987; 1(8): 773-82.
21. Slagle BL, Lee TH, Butel JS. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Progress in medical virology Fortschritte der medizinischen Virusforschung Progres en virologie medicale*. 1992; 39: 167-203.
22. Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature*. 1980; 286(5772): 533-5.
23. Hsu T, Moroy T, Etiemble J, Louise A, Trepo C, Tiollais P, et al. Activation of c-myc by woodchuck hepatitis virus insertion in hepatocellular carcinoma. *Cell*. 1988; 55(4): 627-35.
24. Kekule AS, Lauer U, Meyer M, Caselmann WH, Hofschneider PH, Koshy R. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature*. 1990; 343(6257): 457-61.
25. Sanchez-Quijano A, Jauregui JI, Leal M, Pineda JA, Castilla A, Abad MA, et al. Hepatitis B virus occult infection in subjects with persistent isolated anti-HBc reactivity. *Journal of hepatology*. 1993; 17(3): 288-93.
26. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*. 1981; 2(8256): 1129-33.
27. Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Kyoji M. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology*. 2002; 62 Suppl 1: 29-37.
28. Sakuma K, Saitoh N, Kasai M, Jitsukawa H, Yoshino I, Yamaguchi M, et al. Relative risks of death due to liver disease among Japanese male adults having various statuses for hepatitis B s and e antigen/antibody in serum: a prospective study. *Hepatology*. 1988; 8(6): 1642-6.
29. Sherman M, Peltekian KM, Lee C. Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population. *Hepatology*. 1995; 22(2): 432-8.
30. Villeneuve JP, Desrochers M, Infante-Rivard C, Willems B, Raymond G, Bourcier M, et al. A long-term follow-up study of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive carriers in Montreal. *Gastroenterology*. 1994; 106(4): 1000-5.
31. McMahon BJ, Alberts SR, Wainwright RB, Bulkow L, Lanier AP. Hepatitis B-related sequelae. Prospective study in 1400 hepatitis B surface antigen-positive Alaska native carriers. *Archives of internal medicine*. 1990; 150(5): 1051-4.
32. Manno M, Camma C, Schepis F, Bassi F, Gelmini R, Giannini F, et al. Natural history of chronic HBV carriers in northern Italy: morbidity and mortality after 30 years. *Gastroenterology*. 2004; 127(3): 756-63.
33. Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, Sheen IS, Chiou HY, Chu CM, et al. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2002; 35(6): 1522-7.
34. Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology*. 2002; 123(6): 1848-56.
35. Fattovich G, Giustina G, Sanchez-Tapias J, Quero C, Mas A, Olivotto PG, et al. Delayed clearance of serum HBsAg in compensated cirrhosis B: relation to interferon alpha therapy and disease prognosis. *European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP). The American journal of gastroenterology*. 1998; 93(6): 896-900.

36. Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology*. 2006; 130(3): 678-86.
37. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*. 2006; 295(1): 65-73.
38. Yuen MF, Wong DK, Sablon E, Tse E, Ng IO, Yuan HJ, et al. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. *Hepatology*. 2004; 39(6): 1694-701.
39. Yu MW, Chang HC, Liaw YF, Lin SM, Lee SD, Liu CJ, et al. Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(14): 1159-64.
40. Kew MC, Macerollo P. Effect of age on the etiologic role of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma in blacks. *Gastroenterology*. 1988; 94(2): 439-42.
41. Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100(16): 1134-43.
42. Yuen MF, Tanaka Y, Fong DY, Fung J, Wong DK, Yuen JC, et al. Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2009; 50(1): 80-8.
43. Tanaka S, Takenaka K, Matsumata T, Mori R, Sugimachi K. Hepatitis C virus replication is associated with expression of transforming growth factor-alpha and insulin-like growth factor-II in cirrhotic livers. *Digestive diseases and sciences*. 1996; 41(1): 208-15.
44. Ray RB, Meyer K, Steele R, Shrivastava A, Aggarwal BB, Ray R. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273(4): 2256-9.
45. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med*. 1998; 4(9): 1065-7.
46. Degos F, Christidis C, Ganne-Carrie N, Farmachidi JP, Degott C, Guettier C, et al. Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut*. 2000; 47(1): 131-6.
47. Sun CA, Wu DM, Lin CC, Lu SN, You SL, Wang LY, et al. Incidence and cofactors of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study of 12,008 men in Taiwan. *Am J Epidemiol*. 2003; 157(8): 674-82.
48. Schoniger-Hekele M, Muller C, Kutilek M, Oesterreicher C, Ferenci P, Gangl A. Hepatocellular carcinoma in Austria: aetiological and clinical characteristics at presentation. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 12(8): 941-8.
49. Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology*. 2002; 36(5): 1206-13.
50. Befrits R, Hedman M, Blomquist L, Allander T, Grillner L, Kinnman N, et al. Chronic hepatitis C in alcoholic patients: prevalence, genotypes, and correlation to liver disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1995; 30(11): 1113-8.
51. Rafiq N, Bai C, Fang Y, Srishord M, McCullough A, Gramlich T, et al. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2009; 7(2): 234-8.

52. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2002; 123(1): 134-40.
53. Adami HO, Chow WH, Nyren O, Berne C, Linet MS, Ekbom A, et al. Excess risk of primary liver cancer in patients with diabetes mellitus. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996; 88(20): 1472-7.
54. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine*. 2003; 348(17): 1625-38.
55. Larsson SC, Wolk A. Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies. *British journal of cancer*. 2007; 97(7): 1005-8.
56. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes care*. 2010; 33(7): 1674-85.
57. El-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006; 4(3): 369-80.
58. Chen CL, Yang HI, Yang WS, Liu CJ, Chen PJ, You SL, et al. Metabolic factors and risk of hepatocellular carcinoma by chronic hepatitis B/C infection: a follow-up study in Taiwan. *Gastroenterology*. 2008; 135(1): 111-21.
59. Veldt BJ, Chen W, Heathcote EJ, Wedemeyer H, Reichen J, Hofmann WP, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C cirrhosis and diabetes mellitus. *Hepatology*. 2008; 47(6): 1856-62.
60. Wang CS, Yao WJ, Chang TT, Wang ST, Chou P. The impact of type 2 diabetes on the development of hepatocellular carcinoma in different viral hepatitis statuses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18(7): 2054-60.
61. Lai SW, Chen PC, Liao KF, Muo CH, Lin CC, Sung FC. Risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients and risk reduction associated with anti-diabetic therapy: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2012; 107(1): 46-52.
62. Elmberg M, Hultcrantz R, Ekbom A, Brandt L, Olsson S, Olsson R, et al. Cancer risk in patients with hereditary hemochromatosis and in their first-degree relatives. *Gastroenterology*. 2003; 125(6): 1733-41.
63. Fracanzani AL, Conte D, Fraquelli M, Taioli E, Mattioli M, Losco A, et al. Increased cancer risk in a cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparison to matched control patients with non-iron-related chronic liver disease. *Hepatology*. 2001; 33(3): 647-51.
64. Caballeria L, Pares A, Castells A, Gines A, Bru C, Rodes J. Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: similar incidence to that in hepatitis C virus-related cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96(4): 1160-3.
65. Elzouki AN, Eriksson S. Risk of hepatobiliary disease in adults with severe alpha 1-antitrypsin deficiency (PiZZ): is chronic viral hepatitis B or C an additional risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1996; 8(10): 989-94.
66. Chang MH, You SL, Chen CJ, Liu CJ, Lee CM, Lin SM, et al. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101(19): 1348-55.
67. Kubo S, Nishiguchi S, Hirohashi K, Tanaka H, Tsukamoto T, Hamba H, et al. Clinical significance of prior hepatitis B virus infection in patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1999; 86(5): 793-8.

68. Fattovich G, Giustina G, Degos F, Diodati G, Tremolada F, Nevens F, et al. Effectiveness of interferon alfa on incidence of hepatocellular carcinoma and decompensation in cirrhosis type C. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP). *J Hepatol.* 1997; 27(1): 201-5.
69. Lin SM, Sheen IS, Chien RN, Chu CM, Liaw YF. Long-term beneficial effect of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 1999; 29(3): 971-5.
70. Yuen MF, Hui CK, Cheng CC, Wu CH, Lai YP, Lai CL. Long-term follow-up of interferon alfa treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B infection: The effect on hepatitis B e antigen seroconversion and the development of cirrhosis-related complications. *Hepatology.* 2001; 34(1): 139-45.
71. Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *The New England journal of medicine.* 2004; 351(15): 1521-31.
72. Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriyaama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, et al. Effect of nucleos(t)ide analogue therapy on hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B patients: a propensity score analysis. *J Hepatol.* 2013; 58(3): 427-33.
73. Nishiguchi S, Shiomi S, Nakatani S, Takeda T, Fukuda K, Tamori A, et al. Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic active hepatitis C and cirrhosis. *Lancet.* 2001; 357(9251): 196-7.
74. Valla DC, Chevallier M, Marcellin P, Payen JL, Trepo C, Fonck M, et al. Treatment of hepatitis C virus-related cirrhosis: a randomized, controlled trial of interferon alfa-2b versus no treatment. *Hepatology.* 1999; 29(6): 1870-5.
75. Camma C, Giunta M, Andreone P, Craxi A. Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis: an evidence-based approach. *J Hepatol.* 2001; 34(4): 593-602.
76. Toyoda H, Kumada T, Nakano S, Takeda I, Sugiyama K, Kiriyaama S, et al. Effect of the dose and duration of interferon-alpha therapy on the incidence of hepatocellular carcinoma in noncirrhotic patients with a nonsustained response to interferon for chronic hepatitis C. *Oncology.* 2001; 61(2): 134-42.
77. Hayashi K, Kumada T, Nakano S, Takeda I, Kiriyaama S, Sone Y, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C after interferon therapy. *Hepatogastroenterology.* 2002; 49(44): 508-12.
78. Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004; 130(7): 417-22.
79. Chen JG, Parkin DM, Chen QG, Lu JH, Shen QJ, Zhang BC, et al. Screening for liver cancer: results of a randomised controlled trial in Qidong, China. *Journal of medical screening.* 2003; 10(4): 204-9.
80. Welch HG, Schwartz LM, Woloshin S. Are increasing 5-year survival rates evidence of success against cancer? *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2000; 283(22): 2975-8.
81. Sarasin FP, Giostra E, Hadengue A. Cost-effectiveness of screening for detection of small hepatocellular carcinoma in western patients with Child-Pugh class A cirrhosis. *Am J Med.* 1996; 101(4): 422-34.
82. Arguedas MR, Chen VK, Eloubeidi MA, Fallon MB. Screening for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C cirrhosis: a cost-utility analysis. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98(3): 679-90.
83. Lin OS, Keeffe EB, Sanders GD, Owens DK. Cost-effectiveness of screening for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004; 19(11): 1159-72.
84. Pineda JA, Romero-Gomez M, Diaz-Garcia F, Giron-Gonzalez JA, Montero JL, Torre-Cisneros J, et al. HIV coinfection shortens the survival of patients with hepatitis C virus-related decompensated cirrhosis. *Hepatology.* 2005; 41(4): 779-89.

85. Giordano TP, Kramer JR, Soucek J, Richardson P, El-Serag HB. Cirrhosis and hepatocellular carcinoma in HIV-infected veterans with and without the hepatitis C virus: a cohort study, 1992-2001. *Arch Intern Med.* 2004; 164(21): 2349-54.
86. Merchante N, Merino E, Lopez-Aldeguer J, Jover F, Delgado-Fernandez M, Galindo MJ, et al. Increasing incidence of hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients in Spain. *Clin Infect Dis.* 2013; 56(1): 143-50.
87. Puoti M, Bruno R, Soriano V, Donato F, Gaeta GB, Quinzan GP, et al. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients: epidemiological features, clinical presentation and outcome. *AIDS.* 2004; 18(17): 2285-93.
88. Callewaert N, Van Vlierberghe H, Van Hecke A, Laroy W, Delanghe J, Contreras R. Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics. *Nature medicine.* 2004; 10(4): 429-34.
89. Oka H, Tamori A, Kuroki T, Kobayashi K, Yamamoto S. Prospective study of alpha-fetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 1994; 19(1): 61-6.
90. Theise ND, Fiel IM, Hytioglou P, Ferrell L, Schwartz M, Miller C, et al. Macroregenerative nodules in cirrhosis are not associated with elevated serum or stainable tissue alpha-fetoprotein. *Liver.* 1995; 15(1): 30-4.
91. Lee RG, Tsamandas AC, Demetris AJ. Large cell change (liver cell dysplasia) and hepatocellular carcinoma in cirrhosis: matched case-control study, pathological analysis, and pathogenetic hypothesis. *Hepatology.* 1997; 26(6): 1415-22.
92. Shibata M, Morizane T, Uchida T, Yamagami T, Onozuka Y, Nakano M, et al. Irregular regeneration of hepatocytes and risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis and cirrhosis with hepatitis-C-virus infection. *Lancet.* 1998; 351(9118): 1773-7.
93. Tiniakos DG, Brunt EM. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 labeling in hepatocellular nodules: a comparative study. *Liver.* 1999; 19(1): 58-68.
94. Donato MF, Arosio E, Del Ninno E, Ronchi G, Lampertico P, Morabito A, et al. High rates of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with high liver cell proliferative activity. *Hepatology.* 2001; 34(3): 523-8.
95. Moriyama M, Matsumura H, Aoki H, Shimizu T, Nakai K, Saito T, et al. Long-term outcome, with monitoring of platelet counts, in patients with chronic hepatitis C and liver cirrhosis after interferon therapy. *Intervirology.* 2003; 46(5): 296-307.
96. Velazquez RF, Rodriguez M, Navascues CA, Linares A, Perez R, Sotorrios NG, et al. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Hepatology.* 2003; 37(3): 520-7.
97. Bolondi L, Sofia S, Siringo S, Gaiani S, Casali A, Zironi G, et al. Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis. *Gut.* 2001; 48(2): 251-9.
98. Sherman M. Screening for hepatocellular carcinoma. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 1999; 13(4): 623-35.
99. Chen TH, Chen CJ, Yen MF, Lu SN, Sun CA, Huang GT, et al. Ultrasound screening and risk factors for death from hepatocellular carcinoma in a high risk group in Taiwan. *Int J Cancer.* 2002; 98(2): 257-61.
100. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology.* 2011; 53(3): 1020-2.

101. Adachi Y, Tsuchihashi J, Shiraishi N, Yasuda K, Etoh T, Kitano S. AFP-producing gastric carcinoma: multivariate analysis of prognostic factors in 270 patients. *Oncology*. 2003; 65(2): 95-101.
102. Kojiro M. Focus on dysplastic nodules and early hepatocellular carcinoma: an Eastern point of view. *Liver Transpl*. 2004; 10(2 Suppl 1): S3-8.
103. Yu JS, Kim KW, Kim EK, Lee JT, Yoo HS. Contrast enhancement of small hepatocellular carcinoma: usefulness of three successive early image acquisitions during multiphase dynamic MR imaging. *AJR Am J Roentgenol*. 1999; 173(3): 597-604.
104. Forner A, Vilana R, Ayuso C, Bianchi L, Sole M, Ayuso JR, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008; 47(1): 97-104.
105. Burrel M, Llovet JM, Ayuso C, Iglesias C, Sala M, Miquel R, et al. MRI angiography is superior to helical CT for detection of HCC prior to liver transplantation: an explant correlation. *Hepatology*. 2003; 38(4): 1034-42.
106. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005; 42(5): 1208-36.
107. Leoni S, Piscaglia F, Golfieri R, Camaggi V, Vidili G, Pini P, et al. The impact of vascular and nonvascular findings on the noninvasive diagnosis of small hepatocellular carcinoma based on the EASL and AASLD criteria. *Am J Gastroenterol*. 2010; 105(3): 599-609.
108. Sangiovanni A, Manini MA, Iavarone M, Romeo R, Forzenigo LV, Fraquelli M, et al. The diagnostic and economic impact of contrast imaging techniques in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Gut*. 2010; 59(5): 638-44.
109. Rimola J, Forner A, Reig M, Vilana R, de Lope CR, Ayuso C, et al. Cholangiocarcinoma in cirrhosis: absence of contrast washout in delayed phases by magnetic resonance imaging avoids misdiagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009; 50(3): 791-8.
110. Vilana R, Forner A, Bianchi L, Garcia-Criado A, Rimola J, de Lope CR, et al. Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma in cirrhosis patients may display a vascular pattern similar to hepatocellular carcinoma on contrast-enhanced ultrasound. *Hepatology*. 2010; 51(6): 2020-9.
111. Nakashima Y, Nakashima O, Hsia CC, Kojiro M, Tabor E. Vascularization of small hepatocellular carcinomas: correlation with differentiation. *Liver*. 1999; 19(1): 12-8.
112. Kandil D, Leiman G, Allegretta M, Trotman W, Pantanowitz L, Goulart R, et al. Glypican-3 immunocytochemistry in liver fine-needle aspirates : a novel stain to assist in the differentiation of benign and malignant liver lesions. *Cancer*. 2007; 111(5): 316-22.
113. Park YN, Kojiro M, Di Tommaso L, Dhillon AP, Kondo F, Nakano M, et al. Ductular reaction is helpful in defining early stromal invasion, small hepatocellular carcinomas, and dysplastic nodules. *Cancer*. 2007; 109(5): 915-23.
114. Iwasaki M, Furuse J, Yoshino M, Ryu M, Moriyama N, Mukai K. Sonographic appearances of small hepatic nodules without tumor stain on contrast-enhanced computed tomography and angiography. *J Clin Ultrasound*. 1998; 26(6): 303-7.
115. Fracanzani AL, Burdick L, Borzio M, Roncalli M, Bonelli N, Borzio F, et al. Contrast-enhanced Doppler ultrasonography in the diagnosis of hepatocellular carcinoma and premalignant lesions in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2001; 34(6): 1109-12.
116. Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi S, Sakamoto M, Yamamoto J, Shimada K, et al. Early hepatocellular carcinoma as an entity with a high rate of surgical cure. *Hepatology*. 1998; 28(5): 1241-6.

117. *Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. Hepatology.* 2009; 49(2): 658-64.
118. Nakashima Y, Nakashima O, Tanaka M, Okuda K, Nakashima M, Kojiro M. Portal vein invasion and intrahepatic micrometastasis in small hepatocellular carcinoma by gross type. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology.* 2003; 26(2): 142-7.
119. Forner A, Reig ME, de Lope CR, Bruix J. Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects. *Semin Liver Dis.* 2010; 30(1): 61-74.
120. Bremner KE, Bayoumi AM, Sherman M, Krahm MD. Management of solitary 1 cm to 2 cm liver nodules in patients with compensated cirrhosis: a decision analysis. *Can J Gastroenterol.* 2007; 21(8): 491-500.
121. Silva MA, Hegab B, Hyde C, Guo B, Buckels JA, Mirza DF. Needle track seeding following biopsy of liver lesions in the diagnosis of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut.* 2008; 57(11): 1592-6.
122. Bruix J. Liver cancer: still a long way to go. *Hepatology.* 2011; 54(1): 1-2.
123. Torbenson M. Review of the clinicopathologic features of fibrolamellar carcinoma. *Adv Anat Pathol.* 2007; 14(3): 217-23.
124. Lennerz JK, Chapman WC, Brunt EM. Keratin 19 epithelial patterns in cirrhotic stroma parallel hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol.* 2011; 179(2): 1015-29.
125. Kojiro M, Roskams T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *Semin Liver Dis.* 2005; 25(2): 133-42.
126. Park YN. Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135(6): 704-15.
127. Bioulac-Sage P, Cubel G, Balabaud C, Zucman-Rossi J. Revisiting the pathology of resected benign hepatocellular nodules using new immunohistochemical markers. *Seminars in liver disease.* 2011; 31(1): 91-103.
128. Quaglia A, Jutand MA, Dhillon A, Godfrey A, Togni R, Bioulac-Sage P, et al. Classification tool for the systematic histological assessment of hepatocellular carcinoma, macroregenerative nodules, and dysplastic nodules in cirrhotic liver. *World J Gastroenterol.* 2005; 11(40): 6262-8.
129. Longerich T, Haller MT, Mogler C, Aulmann S, Lohmann V, Schirmacher P, et al. Annexin A2 as a differential diagnostic marker of hepatocellular tumors. *Pathol Res Pract.* 2011; 207(1): 8-14.
130. Di Tommaso L, Destro A, Seok JY, Balladore E, Terracciano L, Sangiovanni A, et al. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2009; 50(4): 746-54.
131. Roskams T, Kojiro M. Pathology of early hepatocellular carcinoma: conventional and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis.* 2010; 30(1): 17-25.
132. Fleming ID. AJCC/TNM cancer staging, present and future. *Journal of surgical oncology.* 2001; 77(4): 233-6.
133. Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer.* 1985; 56(4): 918-28.

134. Vauthey JN, Lauwers GY, Esnaola NF, Do KA, Belghiti J, Mirza N, et al. Simplified staging for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2002; 20(6): 1527-36.
135. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology.* 1998; 28(3): 751-5.
136. Schoniger-Hekele M, Muller C, Kutilek M, Oesterreicher C, Ferenci P, Gangl A. Hepatocellular carcinoma in Central Europe: prognostic features and survival. *Gut.* 2001; 48(1): 103-9.
137. Leung TW, Tang AM, Zee B, Lau WY, Lai PB, Leung KL, et al. Construction of the Chinese University Prognostic Index for hepatocellular carcinoma and comparison with the TNM staging system, the Okuda staging system, and the Cancer of the Liver Italian Program staging system: a study based on 926 patients. *Cancer.* 2002; 94(6): 1760-9.
138. Omagari K, Honda S, Kadokawa Y, Isomoto H, Takeshima F, Hayashida K, et al. Preliminary analysis of a newly proposed prognostic scoring system (SLiDe score) for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004; 19(7): 805-11.
139. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *The British journal of surgery.* 1973; 60(8): 646-9.
140. Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. *Hepatology.* 2000; 31(4): 840-5.
141. Marrero JA, Fontana RJ, Barrat A, Askari F, Conjeevaram HS, Su GL, et al. Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an American cohort. *Hepatology.* 2005; 41(4): 707-16.
142. Grieco A, Pompili M, Caminiti G, Miele L, Covino M, Alfei B, et al. Prognostic factors for survival in patients with early-intermediate hepatocellular carcinoma undergoing non-surgical therapy: comparison of Okuda, CLIP, and BCLC staging systems in a single Italian centre. *Gut.* 2005; 54(3): 411-8.
143. Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis.* 1999; 19(3): 329-38.
144. Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet JM. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell.* 2004; 5(3): 215-9.
145. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology.* 2012; 56(4): 908-43.
146. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996; 334(11): 693-9.
147. Sorensen JB, Klee M, Palshof T, Hansen HH. Performance status assessment in cancer patients. An inter-observer variability study. *British journal of cancer.* 1993; 67(4): 773-5.
148. Kudo M, Chung H, Osaki Y. Prognostic staging system for hepatocellular carcinoma (CLIP score): its value and limitations, and a proposal for a new staging system, the Japan Integrated Staging Score (JIS score). *J Gastroenterol.* 2003; 38(3): 207-15.
149. Kudo M, Chung H, Haji S, Osaki Y, Oka H, Seki T, et al. Validation of a new prognostic staging system for hepatocellular carcinoma: the JIS score compared with the CLIP score. *Hepatology.* 2004; 40(6): 1396-405.
150. Wildi S, Pestalozzi BC, McCormack L, Clavien PA. Critical evaluation of the different staging systems for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg.* 2004; 91(4): 400-8.

151. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol.* 2001; 35(3): 421-30.
152. Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, et al. Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. *Gastroenterology.* 2004; 126(4): 1005-14.
153. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2003; 362(9399): 1907-17.
154. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology.* 2003; 37(2): 429-42.
155. Llovet JM, Bruix J, Gores GJ. Surgical resection versus transplantation for early hepatocellular carcinoma: clues for the best strategy. *Hepatology.* 2000; 31(4): 1019-21.
156. Raoul JL, Guyader D, Bretagne JF, Heautot JF, Duvauferrier R, Bourguet P, et al. Prospective randomized trial of chemoembolization versus intra-arterial injection of 131I-labeled-iodized oil in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 1997; 26(5): 1156-61.
157. Randomized trial of leuprorelin and flutamide in male patients with hepatocellular carcinoma treated with tamoxifen. *Hepatology.* 2004; 40(6): 1361-9.
158. Yuen MF, Poon RT, Lai CL, Fan ST, Lo CM, Wong KW, et al. A randomized placebo-controlled study of long-acting octreotide for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2002; 36(3): 687-91.
159. Ringe B, Pichlmayr R, Wittekind C, Tusch G. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma: experience with liver resection and transplantation in 198 patients. *World journal of surgery.* 1991; 15(2): 270-85.
160. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology.* 2001; 33(6): 1394-403.
161. Marsh JW, Dvorchik I. Liver organ allocation for hepatocellular carcinoma: are we sure? *Liver Transpl.* 2003; 9(7): 693-6.
162. Bruix J, Fuster J, Llovet JM. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Foucault pendulum versus evidence-based decision. *Liver Transpl.* 2003; 9(7): 700-2.
163. Libbrecht L, Bielen D, Verslype C, Vanbeckevoort D, Pirenne J, Nevens F, et al. Focal lesions in cirrhotic explant livers: pathological evaluation and accuracy of pretransplantation imaging examinations. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society.* 2002; 8(9): 749-61.
164. Roayaie S, Frischer JS, Emre SH, Fishbein TM, Sheiner PA, Sung M, et al. Long-term results with multimodal adjuvant therapy and liver transplantation for the treatment of hepatocellular carcinomas larger than 5 centimeters. *Ann Surg.* 2002; 235(4): 533-9.
165. Neuberger J. Developments in liver transplantation. *Gut.* 2004; 53(5): 759-68.
166. Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol.* 2009; 10(1): 35-43.

167. Pelletier SJ, Fu S, Thyagarajan V, Romero-Marrero C, Batheja MJ, Punch JD, et al. An intention-to-treat analysis of liver transplantation for hepatocellular carcinoma using organ procurement transplant network data. *Liver Transpl.* 2009; 15(8): 859-68.
168. Plessier A, Codes L, Consigny Y, Sommacale D, Dondero F, Cortes A, et al. Underestimation of the influence of satellite nodules as a risk factor for post-transplantation recurrence in patients with small hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2004; 10(2 Suppl 1): S86-90.
169. Cillo U, Vitale A, Bassanello M, Boccagni P, Brolese A, Zanusi G, et al. Liver transplantation for the treatment of moderately or well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 2004; 239(2): 150-9.
170. Yao FY, Bass NM, Nikolai B, Davern TJ, Kerlan R, Wu V, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: analysis of survival according to the intention-to-treat principle and dropout from the waiting list. *Liver Transpl.* 2002; 8(10): 873-83.
171. Freeman RB, Jr., Wiesner RH, Harper A, McDiarmid SV, Lake J, Edwards E, et al. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society.* 2002; 8(9): 851-8.
172. Sharma P, Balan V, Hernandez JL, Harper AM, Edwards EB, Rodriguez-Luna H, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: the MELD impact. *Liver Transpl.* 2004; 10(1): 36-41.
173. Pomfret EA, Washburn K, Wald C, Nalesnik MA, Douglas D, Russo M, et al. Report of a national conference on liver allocation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Liver Transpl.* 2010; 16(3): 262-78.
174. Ioannou GN, Perkins JD, Carithers RL, Jr. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: impact of the MELD allocation system and predictors of survival. *Gastroenterology.* 2008; 134(5): 1342-51.
175. Llovet JM, Mas X, Aponte JJ, Fuster J, Navasa M, Christensen E, et al. Cost effectiveness of adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma during the waiting list for liver transplantation. *Gut.* 2002; 50(1): 123-8.
176. Pokorny H, Gnant M, Rasoul-Rockenschaub S, Gollackner B, Steiner B, Steger G, et al. Does additional doxorubicin chemotherapy improve outcome in patients with hepatocellular carcinoma treated by liver transplantation? *Am J Transplant.* 2005; 5(4 Pt 1): 788-94.
177. Majno PE, Adam R, Bismuth H, Castaing D, Ariche A, Krissat J, et al. Influence of preoperative transarterial lipiodol chemoembolization on resection and transplantation for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Ann Surg.* 1997; 226(6): 688-701; discussion -3.
178. Livraghi T, Solbiati L, Meloni MF, Gazelle GS, Halpern EF, Goldberg SN. Treatment of focal liver tumors with percutaneous radio-frequency ablation: complications encountered in a multicenter study. *Radiology.* 2003; 226(2): 441-51.
179. Trotter JF, Wachs M, Everson GT, Kam I. Adult-to-adult transplantation of the right hepatic lobe from a living donor. *The New England journal of medicine.* 2002; 346(14): 1074-82.
180. Strong RW, Lynch SV, Ong TH, Matsunami H, Koido Y, Balderson GA. Successful liver transplantation from a living donor to her son. *The New England journal of medicine.* 1990; 322(21): 1505-7.
181. Gondolesi GE, Roayaie S, Munoz L, Kim-Schluger L, Schiano T, Fishbein TM, et al. Adult living donor liver transplantation for patients with hepatocellular carcinoma: extending UNOS priority criteria. *Ann Surg.* 2004; 239(2): 142-9.

182. *Todo S, Furukawa H. Living donor liver transplantation for adult patients with hepatocellular carcinoma: experience in Japan. Ann Surg. 2004; 240(3): 451-9; discussion 9-61.*
183. *Garcia-Retortillo M, Forns X, Llovet JM, Navasa M, Feliu A, Massaguer A, et al. Hepatitis C recurrence is more severe after living donor compared to cadaveric liver transplantation. Hepatology. 2004; 40(3): 699-707.*
184. *Sarasin FP, Majno PE, Llovet JM, Bruix J, Mentha G, Hadengue A. Living donor liver transplantation for early hepatocellular carcinoma: A life-expectancy and cost-effectiveness perspective. Hepatology. 2001; 33(5): 1073-9.*
185. *Roche B, Samuel D. Liver transplantation for hepatitis B virus-related liver disease: indications, prevention of recurrence and results. Journal of hepatology. 2003; 39 Suppl 1: S181-9.*
186. *Forns X, Garcia-Retortillo M, Serrano T, Feliu A, Suarez F, de la Mata M, et al. Antiviral therapy of patients with decompensated cirrhosis to prevent recurrence of hepatitis C after liver transplantation. Journal of hepatology. 2003; 39(3): 389-96.*
187. *Arii S, Yamaoka Y, Futagawa S, Inoue K, Kobayashi K, Kojiro M, et al. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan. Hepatology. 2000; 32(6): 1224-9.*
188. *Grazi GL, Ercolani G, Pierangeli F, Del Gaudio M, Cescon M, Cavallari A, et al. Improved results of liver resection for hepatocellular carcinoma on cirrhosis give the procedure added value. Ann Surg. 2001; 234(1): 71-8.*
189. *Torzilli G, Makuuchi M, Inoue K, Takayama T, Sakamoto Y, Sugawara Y, et al. No-mortality liver resection for hepatocellular carcinoma in cirrhotic and noncirrhotic patients: is there a way? A prospective analysis of our approach. Arch Surg. 1999; 134(9): 984-92.*
190. *Bruix J, Castells A, Bosch J, Feu F, Fuster J, Garcia-Pagan JC, et al. Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure. Gastroenterology. 1996; 111(4): 1018-22.*
191. *Rees M, Plant G, Wells J, Bygrave S. One hundred and fifty hepatic resections: evolution of technique towards bloodless surgery. The British journal of surgery. 1996; 83(11): 1526-9.*
192. *Poon RT, Fan ST, Ng IO, Wong J. Significance of resection margin in hepatectomy for hepatocellular carcinoma: A critical reappraisal. Ann Surg. 2000; 231(4): 544-51.*
193. *Okada S, Shimada K, Yamamoto J, Takayama T, Kosuge T, Yamasaki S, et al. Predictive factors for postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 1994; 106(6): 1618-24.*
194. *Yamasaki S, Hasegawa H, Kinoshita H, Furukawa M, Imaoka S, Takasaki K, et al. A prospective randomized trial of the preventive effect of pre-operative transcatheter arterial embolization against recurrence of hepatocellular carcinoma. Jpn J Cancer Res. 1996; 87(2): 206-11.*
195. *Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R, Regimbeau JM, Santoro R, Vilgrain V, et al. Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. Annals of surgery. 2003; 237(2): 208-17.*
196. *Adachi E, Maeda T, Matsumata T, Shirabe K, Kinukawa N, Sugimachi K, et al. Risk factors for intrahepatic recurrence in human small hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 1995; 108(3): 768-75.*
197. *Chen YJ, Yeh SH, Chen JT, Wu CC, Hsu MT, Tsai SF, et al. Chromosomal changes and clonality relationship between primary and recurrent hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2000; 119(2): 431-40.*

198. Minagawa M, Makuuchi M, Takayama T, Kokudo N. Selection criteria for repeat hepatectomy in patients with recurrent hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 2003; 238(5): 703-10.
199. Morimoto O, Nagano H, Sakon M, Fujiwara Y, Yamada T, Nakagawa H, et al. Diagnosis of intrahepatic metastasis and multicentric carcinogenesis by microsatellite loss of heterozygosity in patients with multiple and recurrent hepatocellular carcinomas. *J Hepatol.* 2003; 39(2): 215-21.
200. Schwartz JD, Schwartz M, Mandeli J, Sung M. Neoadjuvant and adjuvant therapy for resectable hepatocellular carcinoma: review of the randomised clinical trials. *Lancet Oncol.* 2002; 3(10): 593-603.
201. Lau WY, Leung TW, Ho SK, Chan M, Machin D, Lau J, et al. Adjuvant intra-arterial iodine-131-labelled lipiodol for resectable hepatocellular carcinoma: a prospective randomised trial. *Lancet.* 1999; 353(9155): 797-801.
202. Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, et al. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet.* 2000; 356(9232): 802-7.
203. Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M, Adachi S, Saito A, Takasaki KT, et al. Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med.* 1996; 334(24): 1561-7.
204. Kubo S, Nishiguchi S, Hirohashi K, Tanaka H, Shuto T, Kinoshita H. Randomized clinical trial of long-term outcome after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma by postoperative interferon therapy. *Br J Surg.* 2002; 89(4): 418-22.
205. Mazzaferro V, Romito R, Schiavo M, Mariani L, Camerini T, Bhoori S, et al. Prevention of hepatocellular carcinoma recurrence with alpha-interferon after liver resection in HCV cirrhosis. *Hepatology.* 2006; 44(6): 1543-54.
206. Breitenstein S, Dimitroulis D, Petrowsky H, Puhan MA, Mullhaupt B, Clavien PA. Systematic review and meta-analysis of interferon after curative treatment of hepatocellular carcinoma in patients with viral hepatitis. *Br J Surg.* 2009; 96(9): 975-81.
207. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Nishida M, Maeda Y, Mori N, et al. Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet.* 2003; 361(9361): 923-9.
208. Ye QH, Qin LX, Forgues M, He P, Kim JW, Peng AC, et al. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med.* 2003; 9(4): 416-23.
209. Smith MW, Yue ZN, Geiss GK, Sadovnikova NY, Carter VS, Boix L, et al. Identification of novel tumor markers in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63(4): 859-64.
210. Llovet JM, Wurmbsch E. Gene expression profiles in hepatocellular carcinoma: not yet there. *J Hepatol.* 2004; 41(2): 336-9.
211. Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Wong J. Long-term survival and pattern of recurrence after resection of small hepatocellular carcinoma in patients with preserved liver function: implications for a strategy of salvage transplantation. *Ann Surg.* 2002; 235(3): 373-82.
212. Majno PE, Sarasin FP, Mentha G, Hadengue A. Primary liver resection and salvage transplantation or primary liver transplantation in patients with single, small hepatocellular carcinoma and preserved liver function: an outcome-oriented decision analysis. *Hepatology.* 2000; 31(4): 899-906.

213. Sala M, Fuster J, Llovet JM, Navasa M, Sole M, Varela M, et al. High pathological risk of recurrence after surgical resection for hepatocellular carcinoma: an indication for salvage liver transplantation. *Liver Transpl.* 2004; 10(10): 1294-300.
214. Livraghi T, Giorgio A, Marin G, Salmi A, de Sio I, Bolondi L, et al. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology.* 1995; 197(1): 101-8.
215. Vilana R, Bruix J, Bru C, Ayuso C, Sole M, Rodes J. Tumor size determines the efficacy of percutaneous ethanol injection for the treatment of small hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 1992; 16(2): 353-7.
216. Lencioni R, Vignali C, Caramella D, Cioni R, Mazzeo S, Bartolozzi C. Transcatheter arterial embolization followed by percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 1994; 17(2): 70-5.
217. Lencioni RA, Allgaier HP, Cioni D, Olschewski M, Deibert P, Crocetti L, et al. Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection. *Radiology.* 2003; 228(1): 235-40.
218. Lin SM, Lin CJ, Lin CC, Hsu CW, Chen YC. Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma < or =4 cm. *Gastroenterology.* 2004; 127(6): 1714-23.
219. Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Tateishi R, Fujishima T, et al. A randomized controlled trial of radiofrequency ablation with ethanol injection for small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2005; 129(1): 122-30.
220. Giorgio A, Tarantino L, de Stefano G, Coppola C, Ferraioli G. Complications after percutaneous saline-enhanced radiofrequency ablation of liver tumors: 3-year experience with 336 patients at a single center. *AJR Am J Roentgenol.* 2005; 184(1): 207-11.
221. Tateishi R, Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Koike Y, et al. Percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. An analysis of 1000 cases. *Cancer.* 2005; 103(6): 1201-9.
222. Yamasaki T, Kurokawa F, Shirahashi H, Kusano N, Hironaka K, Okita K. Percutaneous radiofrequency ablation therapy for patients with hepatocellular carcinoma during occlusion of hepatic blood flow. Comparison with standard percutaneous radiofrequency ablation therapy. *Cancer.* 2002; 95(11): 2353-60.
223. Cho YK, Kim JK, Kim MY, Rhim H, Han JK. Systematic review of randomized trials for hepatocellular carcinoma treated with percutaneous ablation therapies. *Hepatology.* 2009; 49(2): 453-9.
224. Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M, Rolle E, Solbiati L, Tinelli C, et al. Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice? *Hepatology.* 2008; 47(1): 82-9.
225. Chen MS, Li JQ, Zheng Y, Guo RP, Liang HH, Zhang YQ, et al. A prospective randomized trial comparing percutaneous local ablative therapy and partial hepatectomy for small hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 2006; 243(3): 321-8.
226. Ito K, Kusunoki H, Okamoto E, Ozawa M, Ishikawa A, Matsuura M, et al. Intra-arterial alcoholization of advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994; 33 Suppl: S42-7.
227. Carr BI, Zajko A, Bron K, Orons P, Sammon J, Baron R. Phase II study of Spherex (degradable starch microspheres) injected into the hepatic artery in conjunction with doxorubicin and cisplatin in the treatment of advanced-stage hepatocellular carcinoma: interim analysis. *Semin Oncol.* 1997; 24(2 Suppl 6): S6-97-S6-9.

228. Bruix J, Castells A, Montanya X, Calvet X, Bru C, Ayuso C, et al. Phase II study of transarterial embolization in European patients with hepatocellular carcinoma: need for controlled trials. *Hepatology*. 1994; 20(3): 643-50.
229. Gunji T, Kawauchi N, Ohnishi S, Ishikawa T, Nakagama H, Kaneko T, et al. Treatment of hepatocellular carcinoma associated with advanced cirrhosis by transcatheter arterial chemoembolization using autologous blood clot: a preliminary report. *Hepatology*. 1992; 15(2): 252-7.
230. Makuuchi M, Sukigara M, Mori T, Kobayashi J, Yamazaki S, Hasegawa H, et al. Bile duct necrosis: complication of transcatheter hepatic arterial embolization. *Radiology*. 1985; 156(2): 331-4.
231. Bruix J, Sala M, Llovet JM. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004; 127(5 Suppl 1): S179-88.
232. Castells A, Bruix J, Ayuso C, Bru C, Montanya X, Boix L, et al. Transarterial embolization for hepatocellular carcinoma. Antibiotic prophylaxis and clinical meaning of postembolization fever. *J Hepatol*. 1995; 22(4): 410-5.
233. Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, et al. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100(10): 698-711.
234. Pelletier G, Ducreux M, Gay F, Luboinski M, Hagege H, Dao T, et al. Treatment of unresectable hepatocellular carcinoma with lipiodol chemoembolization: a multicenter randomized trial. *Groupe CHC. J Hepatol*. 1998; 29(1): 129-34.
235. Llovet JM, Real MI, Montana X, Planas R, Coll S, Aponte J, et al. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002; 359(9319): 1734-9.
236. Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, et al. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2002; 35(5): 1164-71.
237. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular cancer therapeutics*. 2008; 7(10): 3129-40.
238. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008; 359(4): 378-90.
239. Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008; 48(4): 1312-27.
240. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*. 2009; 10(1): 25-34.
241. Okada S. Chemotherapy in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 1998; 45 Suppl 3: 1259-63.
242. Carr BI. Hepatic arterial 90Yttrium glass microspheres (Therasphere) for unresectable hepatocellular carcinoma: interim safety and survival data on 65 patients. *Liver Transpl*. 2004; 10(2 Suppl 1): S107-10.
243. Llovet JM, Sala M, Castells L, Suarez Y, Vilana R, Bianchi L, et al. Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2000; 31(1): 54-8.
244. Seong J, Park HC, Han KH, Chon CY. Clinical results and prognostic factors in radiotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 158 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003; 55(2): 329-36.

245. *Tamoxifen in treatment of hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. CLIP Group (Cancer of the Liver Italian Programme). Lancet. 1998; 352(9121): 17-20.*
246. *Manesis EK, Giannoulis G, Zoumboulis P, Vafiadou I, Hadziyannis SJ. Treatment of hepatocellular carcinoma with combined suppression and inhibition of sex hormones: a randomized, controlled trial. Hepatology. 1995; 21(6): 1535-42.*
247. *Nagasue N, Ito A, Yukaya H, Ogawa Y. Estrogen receptors in hepatocellular carcinoma. Cancer. 1986; 57(1): 87-91.*
248. *Martinez Cerezo FJ, Tomas A, Donoso L, Enriquez J, Guarner C, Balanzo J, et al. Controlled trial of tamoxifen in patients with advanced hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 1994; 20(6): 702-6.*
249. *Pacchioni D, Papotti M, Andorno E, Bonino F, Mondardini A, Oliveri F, et al. Expression of estrogen receptor mRNA in tumorous and non-tumorous liver tissue as detected by in situ hybridization. J Surg Oncol Suppl. 1993; 3: 14-7.*
250. *Chow PK, Tai BC, Tan CK, Machin D, Win KM, Johnson PJ, et al. High-dose tamoxifen in the treatment of inoperable hepatocellular carcinoma: A multicenter randomized controlled trial. Hepatology. 2002; 36(5): 1221-6.*
251. *Villa E, Dugani A, Fantoni E, Camellini L, Buttafoco P, Grottola A, et al. Type of estrogen receptor determines response to antiestrogen therapy. Cancer Res. 1996; 56(17): 3883-5.*
252. *Lee YH, Hsu CY, Huang YH, Su CW, Lin HC, Hsia CY, et al. alpha-fetoprotein-to-total tumor volume ratio predicts post-operative tumor recurrence in hepatocellular carcinoma. J Gastrointest Surg. 2013; 17(4): 730-8.*
253. *Stroffolini T, Trevisani F, Pinzello G, Brunello F, Tommasini MA, Iavarone M, et al. Changing aetiological factors of hepatocellular carcinoma and their potential impact on the effectiveness of surveillance. Dig Liver Dis. 2011; 43(11): 875-80.*
254. *Santi V, Buccione D, Di Micoli A, Fatti G, Frigerio M, Farinati F, et al. The changing scenario of hepatocellular carcinoma over the last two decades in Italy. J Hepatol. 2012; 56(2): 397-405.*
255. *McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. Hepatology. 2009; 49(5 Suppl): S45-55.*
256. *Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. Hepatology. 2002; 36(5 Suppl 1): S35-46.*
257. *Villa E, Karampatou A, Camma C, Di Leo A, Luongo M, Ferrari A, et al. Early menopause is associated with lack of response to antiviral therapy in women with chronic hepatitis C. Gastroenterology. 2011; 140(3): 818-29.*